

Analytik von proteinogenen und niedermolekularen Arzneistoffen unter Verwendung von Hochleistungsflüssigchromatographie, Hochauflösender Kontinuumsstrahler Atomabsorptionsspektrometrie und weiteren Techniken

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig



zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Tobias Felix Rakow
aus Friesoythe

1. Referent: Professor Dr. Hermann Wätzig

2. Referent: Prof. Dr. Ingo Ott

eingereicht am: 31.10.2016

mündliche Prüfung (Disputation) am: 07.02.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Investigating effects of sample pretreatment on protein stability using size-exclusion chromatography and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry

Tobias Rakow, Sami El Deeb, Thomas Hahne, Deia Abd El-Hady, Hassan M. Albishri, Hermann Wätzig

J. Sep. Sci. 2014, 37, 2583 - 2590

Tagungsbeiträge

Using High Performance Size Exclusion Chromatography to investigate the role of sample pretreatment in protein analysis (Poster)

Tobias Rakow, Sandra Grotefend, Lukas Kaminski, Hermann Wätzig

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und der Österreichischen Pharmazeutischen Gesellschaft 2011

Innsbruck, Österreich 20.09.2011 - 23.09.2011

The Influence of sample pretreatment on fragmentation and aggregation of proteins characterized by Size Exclusion chromatography (Poster)

Tobias Rakow, Hermann Wätzig

29th International Symposium of Chromatography 2012

Torun, Polen 09.09.2012 - 13.09.2012

Size Exclusion Chromatography used to monitor fragmentation and aggregation of proteins caused by sample pretreatment (Poster)

Tobias Rakow, Hermann Wätzig

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2012

Greifswald, 10.10.2012 - 13.10.2012

The effects of HPLC-analysis to proteins and how to affect these effects for precise and reproducible protein analytic (Poster)

Tobias Rakow, Hermann Wätzig

39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 2013

Amsterdam, Niederlande 16.06.2013 - 20.06.2013

The effects of HPLC Analysis to Proteins and an AAS method as additional technique for HPLC of metalloproteins (Poster)

Tobias Rakow, Hermann Wätzig

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft 2013

Freiburg, 08.10.2013 - 11.10.2013

Determination of sample losses during the analytical pretreatment of protein containing samples with HP-SEC and HR-CS-AAS (Poster)

Tobias Rakow, Hermann Wätzig

10th International Symposium on Drug Analysis 2014

Lüttich (Liege), Belgien 22.06.2014 - 25.06.2014

Protein Adsorption during HPLC measurements (Poster)

Tobias Rakow, Hermann Wätzig

Freeze Drying of Pharmaceuticals & Biologicals, 2014

Garmisch-Partenkirchen, 23.09.2014 - 26.09.2014

Protein Adsorption during HPLC measurements investigated using High Resolution Continuum source Atomic Absorption Spectrometry (Poster)

Tobias Rakow, Hermann Wätzig

42nd international Symposium of High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques 2015

Genf (Geneva), Schweiz 21.06.2015 - 25.06.2015

Danksagung

Es haben so viele Leute meinen Dank mehr als verdient, dass in dieser Arbeit kaum genug Platz wäre, um ihnen allen zu danken. Es ist mir auch nicht möglich eine Reihenfolge aufzustellen, da viele von ihnen gleich bedeutsam wären - auf die ein oder auf die andere Weise.

Trotzdem möchte ich ein paar von Ihnen beim Namen nennen: Meine Mutter Sigrid und meinen Vater Reinhard - auch wenn es zwischenzeitlich unmöglich erschien und kaum noch wer an mein Werden geglaubt hat - ihr habt es getan, ohne mir je dabei einen Weg, den ich wählte, versperrt zu haben. Meine Geschwister Jan, Astrid und Andrea, ohne deren Erfahrungsschatz ich als Jüngster in der Familie häufig ganz alt ausgesehen hätte. Meine Großeltern und besonders meinen Opa. Von dir habe ich das Wichtigste im Leben geerbt, den Humor. Aber ich möchte auch meinen Freunden Markus und Jonas danken. Nicht viele Menschen haben das Glück, so gute Freunde zu haben, wie ihr es seid. Auch meine lieben Kollegen sollen nicht ungenannt bleiben: Hans-Otto, Thomas, Petra, Sandra, Imke, Mona, Markus, Franzi, Jorrit und dem Rest der Kaffee-Raum-Crew sei gedankt für die kurze Weile um 10 und 15 Uhr - Dank euch war jeder Arbeitstag auch ein klein wenig Urlaubstag. Ich möchte Rosanna dafür danken, dass sie mich ertragen hat, wenn ich endlich vom Schreiben nach Hause kam und es beschwerdelos angenommen hat, wenn ich zum Schreiben wegblieb. Nicht ganz zuletzt möchte ich meinem ehemaligen Klassenlehrer Herr Mischer danken. Ohne mein Wissen empfahlen Sie meinen Eltern, mich vom Gymnasium zu nehmen, weil ich das Abitur niemals schaffen würde - Sie waren das Benzin für meinen Motor.

Ein weiteres kleines Dankeschön geht an meine drei Wahlpflichtfächer, vor allem aber an Niklas und Christina für ihr besonderes Engagement in ihrer Zusammenarbeit mit mir. Dank gebührt auch meiner Apothekenchefin Frau Thomsen und ihrer tollen Crew, mit denen ich immer gerne meine Samstagvormittage geteilt habe. Mein aufrechter Dank geht außerdem an Hermann Wätzig, der mir die Gelegenheit gab an diesem spannenden Thema zu arbeiten und mir dabei alle Freiheiten ließ.

"Das ist hier ja alles schön und gut, aber was hast das nun eigentlich mit Fußball zu tun?"

-

J. Bohlken

Abkürzungsverzeichnis

AAS - Atomabsorptionspektrometrie / Atomabsorptionsspektrometer

AMG - Arzneimittelgesetz

AMWHV - Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung

A_s - Symmetriefaktor eines Peaks

AS - Aminosäure

APR - Aggregation Prone Regions

AUC - Area Under the Curve

BSA - Bovines Serum Albumin

BC - Basiscreme DAC

CDR - Complementary Determining Regions

CE - Kapillarelektrophorese

CHO-Zelle - Chinesische Hamster Ovarialzelle

clogP - berechneter dekadischer Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

CSP - *Core Shell Particles*

CZE - Kapillarzonenelektrophorese

CME - Gemischte Celluloseester

DAC - Deutscher Arzneimittelcodex

DAD - Dioden Array Detektor

DMSO - Dimethylsulfoxid

F-AAS - Flammen AAS

GMP - Good Manufacturing Practice

GF-AAS - Graphite Furnace AAS

HAHA - Humane Anti Human Antikörper

HAMA - Humane Anti Maus Antikörper

HETP - Height Equivalent to a Theoretical Plate

HPLC - Hochleistungs Flüssigchromatographie (aus dem englischen: High performance liquid chromatography)

HR-CS-AAS - High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometer / Spectrometry

ICH - *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IEP - Isoelektrischer Punkt

IgG - Immunglobulin G

logP - dekadischer Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten

MAB - Monoklonaler Antikörper (Monoclonal Antibody)

MAS - MolekülabSORptionsspektrometrie

MES - 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure

mSEC - modifizierte Größenausschlusschromatographie (s. SEC)

NRF - Neues Rezeptur Formularium

p.a. - pro analysi (Qualität von Reagenzien)

PBS - Phosphatpufferlösung (Phosphate Buffer Solution)

Ph.Eur. - Pharmacopoeia Europea, das europäische Arzneibuch

PEEK - Polyetheretherketon

PLB - *Porous Layer Beads*

PTFE - Polytetrafluorethylen

PVDF - Polyvinylidendifluorid

rpm - Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)

R_s - Chromatographische Auflösung

RSD - Relative Standardabweichung (Relative Standard Deviation)

SDS - Natriumdodecylsulfat

SEC - Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography)

S/N - Signal-Rausch-Verhältnis

SS - Rostfreier Edelstahl (Stainless Steel)

t_R - Retentionszeit

USP - United States Pharmacopeia

UHPLC / UPLC - Ultra Hochleistungs-Flüssigchromatographie

UV - Ultraviolett

vfa - Verband der forschenden Arzneimittelhersteller

XBL - Xenonkurzbogenlampe

ZPC - *Point of Zero Charge*

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	i
Danksagung	iv
Abkürzungsverzeichnis	vi
Inhaltsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
2 Proteine als Arzneistoffe	5
2.1 Modellproteine	9
2.2 Antikörper aus Studie	12
2.3 Gründe für das Scheitern einer Klinischen Studie	15
2.4 Qualitätskontrolle	16
3 Niedermolekulare Arzneistoffe	18
3.1 Wirkstoffe	20
3.1.1 Keine Wirkung ohne Nebenwirkung!	20
3.1.2 Stabilitäten	21
3.2 Analytik von Arzneistoffen	22
3.3 Keine Validierung ohne Qualifizierung; ohne Qualifizierung keine Qualität	24
4 HPLC	26
4.1 Prinzip der HPLC	26
4.1.1 Qualität der Partikel	27
4.1.2 Material und Oberflächenchemie der Partikel	33
4.1.2.1 Kieselgelbasiertes Säulenmaterial und der pH-Wert	34
4.1.2.2 Monolithische Umkehrphasen	35
4.1.2.3 Effekt der Herstellung monolithischer Umkehrphasen auf die Trennleistung	36
4.1.2.4 Core-Shell Partikel	39
4.1.3 Mobile Phasen für die Umkehrphasenchromatographie	41
4.1.4 SEC	43
4.1.4.1 Anwendungsgebiete und Trennprinzip	43
4.1.4.2 Die stationäre Phase - oder etwa nicht?	46
4.1.4.3 Mobile Phasen für die SEC	47

4.1.4.4	Vergleich zweier Säulen unter mSEC und iSEC-Bedingungen	49
4.2	Probenvorbereitung - nicht immer unproblematisch	54
4.2.1	Frier-Tau-Zyklen.....	55
4.2.2	Ultraschall.....	61
4.2.2.1	Untersuchung der Unbedenklichkeit von Ultraschall in der Probenvorbereitung	63
4.2.2.2	Über das Entgasen von Flüssigkeiten	66
4.2.3	Filtration	67
5	Analytik einer halbfesten Arzneimittelzubereitung	70
5.1	Matrices.....	71
5.2	Unterschiede in der Galenischen Qualität	74
5.2.1	Sandwichverfahren vs. manuelles Anreiben.....	75
5.2.2	Vermeiden der Artefaktsichtung.....	76
5.2.3	Temperaturwechsel und Kühlung	76
5.3	Extraktion	79
5.4	Chromatographie	79
5.4.1	Zuordnung von Erythromycin-Hydrolyseprodukten	81
5.4.2	Methodenoptimierung mittels High Resolution-Monolithen.....	82
5.5	CE als weitere Möglichkeit	85
5.6	Lagerung	87
5.6.1	Einfluss des pH-Wertes.....	88
5.6.1.1	Metronidazol	89
5.6.1.2	Erythromycin	92
5.7	Photolabilität von Metronidazol	94
6	HR-CS-AAS	98
6.1	Prinzip der AAS	98
6.2	Atomisierungstechniken.....	99
6.2.1	Flammentechnik.....	99
6.2.2	Graphitrohrfentechnik und Temperaturprogramm.....	101
6.3	Das optische System.....	103
6.4	Untersuchung des Einflusses der Probenvorbereitung in der Größenausschlusschromatographie mittels HR-CS-AAS und UV-VIS.....	104
6.3.1	Versuchsaufbau und verwendete Oberflächen	106

6.3.2	Restriktorversuch mittels UV-Detektion	109
6.3.2.1	Detektionswellenlänge	109
6.3.2.2	Diffusion - ganz ohne geht es nicht!	110
6.3.2.3	Einfluss der Ionenstärke	111
6.3.3	Restriktorversuch mittels Atomabsorptionsspektrometrie	117
6.3.3.1	Wahl des Eluenten und Methodenharmonisierung	120
6.3.3.2	Methodenentwicklung und Optimierung	123
6.3.3.3	Ergebnisse der Atomabsorptionsspektrometrie	124
7	Zusammenfassung	130
8	Experimenteller Teil	133
8.1	HPLC-Geräte	133
8.1.1	Modifikationen am Gerät	133
8.1.2	Filtermaterialien	134
8.1.3	Umkehrphasen-Säulen	134
8.1.3.1	Hausinterner Systemtest für HPLCs	135
8.1.3.2	Methoden	137
8.1.4	SEC-Säulen und Vorsäulen	138
8.1.4.1	Methoden	138
8.1.4.1.1	mSEC	139
8.1.4.1.2	iSEC	140
8.1.5	Chemikalien und Proteine	140
8.2	HR-CS-AAS	141
8.2.1	Methoden	141
8.2.2	Chemikalien	142
8.3	Herstellung halbfester Zubereitungen	142
8.4	Kapillarzonen-elektrophorese (CZE)	142
8.3.1	Methode	143
8.5	Grindometer	143
8.6	Polarisationsmikroskop	143
8.7	Software	144
9	Anhang	145

9.1	Anhang zu Kapitel 5	145
9.2	Anhang zu Kapitel 4 und Kapitel 6.....	149
	Literaturverzeichnis.....	152
	Lebenslauf... ..	162

1 Einleitung

Nach dem Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (AMG) haben Arzneimittel den Zweck, Krankheiten zu heilen, zu lindern, zu verhüten, die physiologische Funktion des Behandelten wiederherzustellen oder zu beeinflussen oder dabei zu helfen, eine Diagnose zu stellen [1].

Der Zweck dieses Gesetzes ist es "für die Sicherheit im Verkehr mit Arzneimitteln, insbesondere für die Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Arzneimittel" zu sorgen [1].

Der Grund für die heute gültige Arzneimittelrechtsprechung fußt auf Arzneimitteltragödien der Vergangenheit. Ein früher, dokumentierter Fall ereignete sich im Jahr 1937, wo es in den USA zu mehreren hundert Todesfällen nach Einnahme einer sulfanilamidhaltigen, flüssigen Zubereitung kam, welche mit giftigem Diethylenglykol kontaminiert war. Etwa 22 Jahre später, 1957 -1961, kam es nach Einnahme von thalidomidhaltigen Tabletten weltweit zu schweren Dysmelien und Aplasien, einem Fehlen oder einer Fehlbildung von inneren und äußeren Organen während der embryonalen Entwicklung. Als Reaktion darauf wurde im Jahre 1961 in Deutschland erstmals ein Gesetz formuliert, welches sich allein mit der Sicherheit im Verkehr von Arzneimitteln befasste. Im Jahr 1978 wurde dieses durch die heute noch gültige Form des Arzneimittelgesetzes ersetzt. Dennoch kommt es auch in neuerer Zeit zu Vorfällen mit Arzneimitteln. Im Jahr 2006 kam es während einer klinischen Studie zu starken, unerwünschten Wirkungen nach Verabreichung des Antikörpers TGN1412, die auf der Heterogenität der Zielstruktur (*Target*) zwischen Tiermodell und Mensch beruhten. Als Tiermodell wurden dabei zuletzt erfolgreich Makaken getestet. Bei dem Target handelt es sich um ein Protein, welches auf T-Zelllymphozyten exprimiert wird. Die Aminosäuresequenz dieses CD28-Moleküls unterscheidet sich beim Menschen geringfügig von der Sequenz im Makaken. Durch diese geringe Abweichung der Aminosäuresequenz liegen die CD28-Moleküle beim Menschen in einer etwas anderen Faltung (Konformation) vor. TGN1412 bindet beim Menschen deswegen an einer etwas zellnäheren Position. Da die Abstände zweier CD28-Moleküle in Zellnähe geringer sind, kann ein TGN1412-Antikörper nur beim Menschen zwei CD28-Moleküle vernetzen (*Crosslinking*). Dieses Crosslinking führt zu einer konzertierten Ausschüttung an proinflammatorischen Zytokinen durch die T-Zellen, was eine lebensbedrohliche Situation auslöst [2, 3]. Da es sich um die Phase 1 im Studienplan handelte, waren nur wenige gesunde Studienteilnehmer betroffen. Ein größeres Patientenkollektiv wie in den zuvor genannten, Fällen wurde so verschont.

Dieser Vorfall zeigt einerseits den Sinn einer Gesetzgebung, welche die Sicherheit bzw. die Qualität von Arzneimitteln auch bereits während der klinischen Erprobung fordert und fördert, andererseits wird deutlich, dass allein aufgrund der Komplexität der Arzneimittelwirkung auf den Organismus Vorfälle wie diese nicht vollends ausgeschlossen werden können. Zur Gewährleistung der Qualität von Arzneimitteln sind im deutschen Arzneimittelrecht Arzneibücher vorgeschrieben. Diese enthalten unter anderem Vorschriften und Spezifikationen zur Prüfung von bereits zugelassenen Arzneimitteln. Das Europäische Arzneibuch führt eine allgemeine Monographie zu monoklonalen Antikörpern "Anticorpora monoclonalia ad usum humanum" [4]. Diese ist bewusst mit viel Handlungsspielraum verfasst und gibt keine konkreten Vorgaben zur Analytik von Antikörpern vor. Die United States Pharmacopeia (USP) arbeitet seit 2012 an einer allgemeinen Monographie (*general chapter*) für monoklonale Antikörper. Diese ist am 1.5.2016 erschienen und in Kraft treten [5, 6]. Die USP schreibt darin die Verwendung der Kapillarelektrophorese unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) und der Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Analyse von Antikörpern vor. Letztere Technik hat sich in der Größenanalyse von Proteingemischen bereits vielfach etabliert. Es wurde zuletzt auch gezeigt, dass quantitative Bestimmungen verlässlich und mit hoher Präzision durchführbar sind [7]. Durch gezieltes Manipulieren der mobilen Phase können zusätzliche Trenneffekte erreicht werden, welche es außerdem ermöglichen, Proteine derselben Größe chromatographisch aufzutrennen. In diesem Fall ist vom modifizierten Modus bzw. modifizierter SEC die Rede [8].

Der Stellenwert der SEC wird in einem der Standardwerke zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) von Stavros Kromidas frei übersetzt beschrieben: "Es ist die einzige Technik, mit der die Verteilung der Eigenschaften [einer Probe] in einem weiten Anwendungsbereich zuverlässig und effizient gemessen werden können. Daher ist die Größenausschlusschromatographie anderen Techniken wie der Viskosimetrie, Osmometrie oder der dynamischen Lichtstreuung überlegen, welche lediglich die Bestimmung von Durchschnittswerten für die Eigenschaften [einer Probe] erlauben." [9, S. 359]. Die SEC ist in Verbindung mit einem handelsüblichen UV- oder DA-Detektor neben dieser Fähigkeit außerdem eine kostengünstige Technik mit hoher Robustheit und einem weiten linearen Bereich bei gleichzeitig niedrigen Nachweisgrenzen.

Obwohl, oder gerade weil die SEC einen festen Stellenwert in der Analytik von Biomolekülen hat, darf bei der Anwendung dieser Technik nicht weniger kritisch verfahren werden. Aufgrund der Struktur der verwendeten stationären Phasen kommt es zur Adsorption von Probe auf einer fabrikneuen stationären Phase. Dieser Effekt wird häufig als Priming-Effekt bezeichnet [10]. Der Priming-Effekt lässt sich jedoch nicht nur bei fabrikneuen Trennsäulen beobachten, wie in Kapitel 4.1.4.4 noch genauer erläutert wird. Außerdem bergen die zumeist wässrigen Eluenten die Gefahr von mikrobiellen Kontaminationen, welche sich auf die Proben (s. Kapitel 4.1.4.4 bzw. Abbildung 4.9) und auf das Säulenmaterial auswirken.

In dieser Arbeit wird gezeigt, inwiefern die Quantifizierung von Proteinen mittels der SEC als kritisch anzusehen ist. Dabei muss nicht nur der chromatographische Prozess an sich, sondern alle Schritte der Probe, von der Probenvorbereitung bis hin zum Ergebnis der Analyse, betrachtet werden.

Sowohl proteinogenen als auch niedermolekularen Arzneimitteln ist gemein, dass dem Patienten eine Möglichkeit zur Kontrolle fehlt. Anders als bei Lebensmitteln ist der Patient bei Arzneimitteln nicht in der Lage zu entscheiden, ob es noch verwendet werden kann oder nicht. Aus diesem Grund werden für Fertigarzneimittel aufwendige Haltbarkeitsstudien durchgeführt. Diese sollen garantieren, dass ein Medikament über die Verwendbarkeitsdauer nicht nur sicher, sondern auch noch wirksam ist. Einen Sonderfall stellen dabei Rezeptur-arzneimittel dar. Diese werden in kleinen Stückzahlen in Apotheken patientenindividuell hergestellt. In Rezeptursammlungen wie dem Neuen Rezepturformularium sind standardisierte Rezepturen zusammengestellt. Man findet dort auch Angaben zur Haltbarkeit der Zubereitungen. Je nach Wassergehalt, Art der Verpackung und vorhandenen Konservierungsstoffen beläuft sich die Haltbarkeit auf 14 Tage bis 3 Jahre [11]. Wird jedoch von den dort angegebenen Rezepturvorschriften abgewichen, muss auf pauschale Haltbarkeitswerte zurückgegriffen werden. Diese werden unabhängig von Art der Wirkstoffe und den Lagerungsbedingungen vergeben. Die Verwendbarkeitsdauer muss in diesen Fällen eher kurz angesetzt werden, was zum einen den Patienten verunsichert und auch zu Complianceproblemen führt. So ist bei 100 Gramm einer Zubereitung, welche einmal täglich auf das Gesicht aufgetragen werden soll, eine Verwendbarkeitsdauer von 2 Wochen knapp bemessen. Besonders relevant ist diese Problematik bei Arzneistoffen, deren labile Molekularstruktur bekannt ist. Am Beispiel der Wirkstoffe Erythromycin und Metronidazol wurde die Stabilität einer halb-

festen Zubereitung untersucht, die hinsichtlich ihrer Verschreibungshäufigkeit und der kritischen Kombination der Wirkstoffe als besonders geeignet für diese Untersuchung erschien.

2 Proteine als Arzneistoffe

Der Marktanteil von proteinogenen, rekombinant hergestellten Wirkstoffen steigt stetig an. Maßgeblich daran beteiligt sind therapeutische Antikörper, die gegen eine Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt werden [12, 13]. Laut einer Studie des Verbandes der forschenden Pharmaunternehmen (vfa) stieg im Jahr 2013 der Umsatz mit Biopharmazeutika in Deutschland im Vergleich zum Vorjahr um 8,5 % auf 6,5 Milliarden Euro. Mehr als 300 therapeutische Antikörper befanden sich zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Studie in klinischer Testung (285 in Phase I-II, 48 in Phase III) [14].

Biopharmazeutika werden mittels Zelllinien hergestellt, welche als Kulturen in Bioreaktoren gehalten werden. Im Jahr 2004 wurden 60-70 % der so erzeugten Wirkstoffe in immortalisierten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) produziert [15], 2014 wurden noch 42 % der Biopharmazeutika aus CHO-Zellen gewonnen. Insuline werden häufig in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) oder Darmbakterien (*Escherichia coli*) produziert, aber auch humane Zellen und Pilzkulturen kommen zum Einsatz [16].

Dabei lässt sich die folgende Faustregel formulieren: Je stärker die verwendeten Zellen humanen Zellen ähneln, desto komplexer ist die Instandhaltung einer Kultur [17], desto langsamer läuft die Proteinsynthese (Prokaryoten sind etwa um den Faktor 10 schneller [18]) und desto mehr gleicht das entstehende Protein den körpereigenen, womit die Gefahr der Entwicklung einer Immunogenität sinkt [19]. Ein zentraler Unterschied zwischen den Zellarten ist die Fähigkeit zu posttranslationalen Modifikationen. Prokaryotische Zellen (zumeist wird *E. coli* eingesetzt) verfügen nicht über ein Endoplasmatisches Retikulum. Außerdem weist ihr zytosolischer Raum reduktive Eigenschaften auf, was ein Sezernieren von Proteinen mit Disulfidbrücken vereitelt. Disulfidbrücken sind jedoch wichtige struktur- und somit auch funktionsgebende Elemente für die entstehenden Proteine. So weisen Insuline stets drei Disulfidbrücken auf (s. Abbildung 2.1), die für die Funktion essentiell sind. Dennoch wurde viel Arbeit in die Entwicklung eines rentablen *E.coli*-Modells zur Herstellung für Insulin gesteckt. Ein heute noch im großen Stile verwendetes Verfahren wird von der Firma Sanofi-Aventis und Eli Lilly angewandt [20]. In das Genom von *E.coli* wird eine Sequenz eingebracht, die ein Peptid translatiert, welches aus allen drei Insulin-Peptidketten besteht. Da die Translation fast immer an einem Methionincodon beginnt, wurde am N-Terminus noch ein Methioninrest eingefügt. Nach Isolierung dieses Proteins in Folge der Zelllyse, wird durch

Halogencyan der Methioninrest entfernt. Anschließend werden oxidativ Disulfidbrücken geknüpft, bevor durch den Einsatz von Carboxypeptidase B und Trypsin das C-Peptid abgetrennt wird [21]. Eine weitere Entwicklung zur effizienten Gewinnung von Proinsulin aus *E.coli* wurde von Winter *et al.* beschrieben. Hierbei wird das Erbgut der Bakterien so verändert, dass diese ein Fusionsprotein aus Proinsulin und einer Disulfid-Oxidoreductase exprimieren, sodass im periplasmatischen Raum Disulfidbrücken ausgebildet werden, wo keine reduktiven Bedingungen vorliegen [22]. Das Fusionsprotein wird durch Zerstörung der Bakterien gewonnen und muss dann gereinigt und chemisch bearbeitet werden. Eine Zerstörung der Bakterien ist unerlässlich, da es mit prokaryotischen Systemen nicht gelingt die Proteine zu sezernieren [23, S. 7].

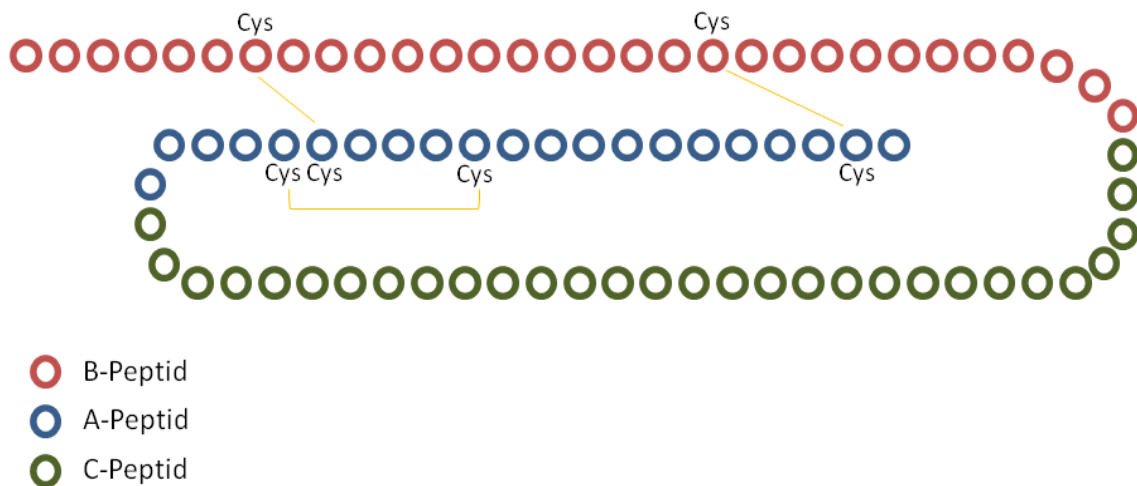


Abbildung 2.1 - Schematische Darstellung von (humanem) Proinsulin. Die Aminosäure Cystein ist durch die Buchstaben Cys gekennzeichnet. Zwischen den Cysteinmolekülen werden Disulfidbrücken (gelb) ausgebildet, welche für die Faltung bzw. Funktion des Insulinmoleküls essenziell sind.

Die eukaryotischen Hefezellen sind in der Lage, Disulfidbrücken zu verknüpfen [23, S. 6–7, 24, S. 4–5] und auch Proteine ins umgebende Medium zu sezernieren. Letzteres erleichtert die Aufreinigung immens, da auch die Zellfragmente und möglichen Pyrogene aus der Zerstörung der produzierenden Mikroorganismen wegfallen [23, S. 7]. Hefezelllinien sind zwar anders als Prokaryoten zur posttranslationalen Glykosylierung fähig, weisen jedoch ein gegenüber Wirbeltierzellen verändertes Glykosylierungsmuster der gebildeten Proteine auf, da ihnen bestimmte Glykosyltransferasen fehlen, über die eukaryotische Zellen verfügen [24, S. 4–5]. Dies wirkt sich auf die Struktur sowie auf die Funktionalität bzw. Wirksamkeit, Löslichkeit, Stabilität und immunogenen Eigenschaften der Proteine aus [25]. Proteine aus CHO-Zelllinien weisen ein dem menschlichen Körper sehr ähnliches Glykosylierungsmuster auf,

sodass therapeutisch genutzte Proteine, deren Funktionalität von der Glykosylierung abhängt, in Säugetierzellen produziert werden sollten [20]. Zudem ist die Fähigkeit zur Fehlerkorrektur, dem sogenannten *proofreading*, bei prokaryotischen Zellen gegenüber eukaryotischen nicht vorhanden. Etwa eine von tausend Aminosäuren wird bei der Translation fehlerhaft verarbeitet. Daraus ergibt sich eine Vielzahl an Molekülen bzw. ein heterogenes Gemisch des gleichen Proteins, welches auch durch die nachfolgenden technologischen Aufreinigungsprozesse nicht vollständig homogenisiert werden kann [26–28]. Es liegen also, anders als bei den meisten synthetisierten niedermolekularen Arzneistoffen, "Gemische" vor, was die Kontrolle deren Qualität zusätzlich kompliziert. Außerdem werden niedermolekulare Arzneistoffe häufig oral verabreicht. Proteine müssen aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften zumeist parenteral verabreicht werden. Niedermolekulare Arzneistoffe, die größtenteils gezielt chemisch synthetisiert werden, haben definierte chemische und physikalische Eigenschaften. In der Regel sind pK-Werte, hydrolytische bzw. photolytische Stabilität, Löslichkeit und Kristallstruktur bekannt. Im Jahr 1997 wurden von Christopher Lipinski Regeln für die Bioverfügbarkeit oral applizierter Arzneistoffe aufgestellt - Lipinskis *Rule of Five*. Diese besagen, dass in einem Arzneistoffmolekül nicht mehr als fünf Wasserstoffbrückendonatoren und nicht mehr als 10 Wasserstoffbrückenakzeptoren vorhanden sein sollten. Außerdem soll das Molekulargewicht 500 g/mol bzw. Dalton nicht übersteigen und der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (logP) muss unter 5 liegen [29]. Diese wurden dann, obwohl bereits vorher veröffentlicht, erst einige Jahre später durch A. Ghose erweitert. Es wurde unter anderem die Zahl der Atome auf maximal 70 begrenzt und ein unterer Grenzwert von -0,5 für den logP eingeführt [30]. Zwar sind diese Regeln auch nach der Erweiterung nur als Faustregel zu verstehen, geben jedoch die Dimension vor, in denen Arzneistoffe chemisch einzuordnen sind. Selbst kleinste Proteine wie das Vasopressin (s. Abbildung 2.2), bestehend aus lediglich 9 Aminosäuren (AS), weisen jedoch ein Molekulargewicht von 1000 g/mol und über 100 Atome auf. Außerdem sind die meisten Proteine stark hydrophil. So weist beispielsweise Vasopressin einen kalkulierten clogP von -3,9, fünfzehn Wasserstoffbrückenakzeptoren und siebenundzwanzig Wasserstoffbrückendonatoren auf.

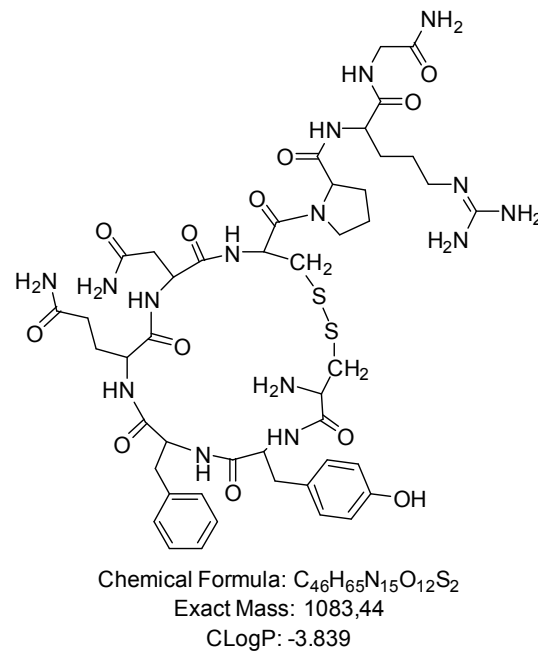


Abbildung 2.2 - Strukturformel von Vasopressin. Die angegebenen Daten wurden mit Chemdraw 13.0 ermittelt.

Es liegt also fern, proteinogene Wirkstoffe oral zu applizieren [31]. Es existieren jedoch neben der invasiven, alternative Applikationsmöglichkeiten. So kann Oxytocin nasal appliziert werden, wobei auf diesem Wege auch die hydrolytische Zersetzung des Wirkstoffes hinausgezögert wird. Die hydrolytische Instabilität von Proteinen wirkt erschwerend bei der Findung stabiler Wirkstoffe und deren Darreichungsformen sowie einer akzeptablen Wirkungs-dauer bei Anwendung. Vor allem extreme pH-Werte und eine Vielzahl von Peptidasen sorgen für einen raschen Wirkverlust in vivo [32].

Neben den generellen Anforderungen an Arzneistoffe lassen sich die speziellen Anforderungen an proteinogene Arzneistoffe daher wie folgt zusammenfassen:

- a) Es ist ein hohes Ausmaß an chemischer Stabilität nötig, um eine Verarbeitung als Fertigarzneimittel zu ermöglichen.
- b) Auch unter Stressbedingungen darf es nur in einem vertretbaren Ausmaß zur Aggregation und Fragmentierung kommen.
- c) Die Halbwertszeit muss ein sinnvolles Dosierungsintervall ermöglichen.
- d) Es soll möglichst keine Immunogenität entstehen.
- e) Ein hohes Maß an Homogenität soll vorhanden sein.

Sowohl c) als auch d) werden erreicht, indem die Wirkstoffe möglichst stark den körpereigenen Proteinen ähneln. Dies wird für therapeutische Antikörper erreicht, indem humanisierte Antikörper verwendet werden. Hierbei ist fast die ganze Aminosäuresequenz analog zu humanen IgG-Antikörpern. Lediglich die *Complementary Determining Regions* (CDR), welche für die Antigenbindung verantwortlich sind, sind häufig murinen Ursprungs [19]. Die so konzipierten Antikörper verursachen seltener unerwünschte Reaktionen des Immunsystems. Vor der Einführung solcher humanisierten Antikörper wurden noch häufiger sogenannte HAMA-Antworten (Humane-Anti-Maus-Antikörper)-Antworten beobachtet. Zwar werden nach der Einführung humanisierter Antikörper auch HAHA (Humane-Anti-Human-Antikörper)-Antworten beobachtet. Diese sind jedoch seltener als Reaktionen auf murine oder chimäre Antikörper [19].

Die Punkte a) und b) sind in der Art der molekularen Struktur von Proteinen begründet. Diese ist nur bedingt beeinflussbar, da die Struktur der Proteine stark mit ihrer Funktion verknüpft ist. Eine gängige Methode zur Konservierung von Proteinen ist die Gefriertrocknung. Proteinlösungen werden dabei direkt im Primärpackmittel (häufig Vials aus hochinertem Glas) gefriergetrocknet. Der Entzug von Wasser verhindert effizient die Hydrolyse der Proteine, jedoch ist der Prozess der Gefriertrocknung an sich kritisch [33, 34]. So ist besonders der Entzug des Wassers und die so veränderte Umgebung der Proteinmoleküle ein Stressfaktor, welcher zur Entfaltung, Strukturverlust und Aggregation führen kann.

Wie bereits erwähnt, ist eine vollständige Homogenität einer biotechnologisch hergestellten Substanz nur theoretisch zu gewährleisten. Man versucht jedoch, Punkt e) in der Produktion zu erfüllen, indem die erhaltenen Proteine aufwändig gereinigt werden. Diese Aufreinigung muss im Kompromiss zur erhaltenen Ausbeute stehen und darf dem Zielprotein nicht oder nur geringsten Schaden zufügen.

Verschiedene Stressfaktoren wurden für diese Arbeit simuliert und die Effekte auf Proteine untersucht. Da aus Kostengründen nicht immer therapeutisch aktive Proteine verwendet werden konnten, wurden Modellproteine verwendet.

2.1 Modellproteine

Aufgrund der hohen Preise für therapeutisch verwendete Proteinarzneimittel werden in der Forschung häufig Modellproteine verwendet. Diese sind in hohen Reinheiten zu moderaten

Preisen über diverse Hersteller beziehbar. Die Reinheit ist hier besonders wichtig, um sicherzustellen, dass Beobachtungen bei Experimenten nicht durch Verunreinigungen der Modellproteine bedingt sind [27, 28]. Solche fehlerhaften Beobachtungen werden dann, vor allem in der Chromatographie, häufig als "Artefakte" bezeichnet. Die Modellproteine für diese Arbeit wurden nach unterschiedlichen Gesichtspunkten ausgewählt:

- Größe des Proteins. Tatsächlich wird das Gewicht in Kilodalton (kDa) betrachtet, da es eine messtechnisch leicht zu erfassende Größe ist, welche unabhängig von äußeren Faktoren ist. Der Zusammenhang zwischen Größe und Gewicht ist unter nativen Bedingungen jedoch nicht linear, da verschiedene Proteine unregelmäßig gefaltet sind und sich daher in ihrer Form bzw. Größe bei gleichem Gewicht unterscheiden. Das Gewicht von Proteinen erstreckt sich über einen weiten Bereich zwischen etwa 1 kDa, wie z.B. das Peptidhormon Vasopressin, welches aus 9 Aminosäuren besteht (s. Abbildung 2.2), und Titin mit 3600 kDa aus etwa 30.000 Aminosäuren. IgG-Antikörpermonomere weisen eine Größe von etwa 150 kDa und Thyreoglobulin, ein Protein aus der Schilddrüse, weist ein Molekulargewicht von etwa 660 kDa auf. Da Antikörper eine zentrale Rolle in dieser Arbeit spielen, wurden Modellproteine gewählt, deren Größenbereich sowohl die Analyse von Fragmenten als auch die von oligomeren Aggregaten von IgG-Antikörpern, also ein Vielfaches von 150 kDa umfasst. Thyreoglobulin wurde daher als obere Grenze, Myoglobin mit 17 kDa als untere Grenze des Größenbereichs gewählt.

Es sei darauf hingewiesen, dass bei Molekülen mit weniger als 40 AS in der Regel von (Poly-)Peptiden die Rede ist [32]. Ab dieser Größe sind Proteine in der Lage, eine bestimmte Funktion wie z.B. Katalyse als Enzym auszuüben. Unterhalb dieser Grenze finden sich viele Hormone, wie das bereits angesprochene Vasopressin (9 AS), Oxytocin (9 AS) oder Somatostatin (14 AS).

- Isoelektrischer Punkt (IEP). Proteine verhalten sich teilweise stark pH-abhängig. Wenn der pH-Wert der Umgebung dem Wert des IEP entspricht, weist das Protein keine Nettoladung auf. In diesem Zustand sind Proteine anfälliger für Interaktionen mit Oberflächen oder anderen Proteinmolekülen. Diese Eigenschaft kann man sich bei der chromatogra-

phischen Trennung von zwei Proteinen zu Nutze machen, wie weiter unten besprochen wird.

Protein	IEP	Größe in kDa
Ovalbumin	4,8-5,15 [35] 4,9 [36] 4,7 [37]	47
Bovines Serum Albumin	5,5-5,8 [35] 4,2-4,9 [36] 4,98 - 5,18 [37]	65 - 69
Thyreoglobulin	4,4-4,7 [38] Porcin: 4,58 (nativ), 5,00 (denat.) [37, 39, 40] Bovin: ca. 5,3 [41]	660 - 670
Myoglobin	7,0-7,4 [35] 6,99 [36] 7,33 und 6,88 [37]	17 - 17,5

Tabelle 2.1 - Isoelektrische Punkte und Größe von ausgewählten Modellproteinen. Die Isoelektrischen Punkte variieren je nach Quelle und Bestimmungsmethode. Der angegebene Größenbereich setzt sich aus den in der Spalte zum IEP angegebenen Quellen zusammen.

- Proteinfamilie. Proteine lassen sich in zwei große Gruppen einteilen, die fibrillären und die globulären Proteine. Viele neuere Arzneimittel gehören zur Gruppe der Globuline, welche zu den globulären Proteinen zählen. So sind Antikörper Gamma(γ)-Globuline, woher auch der Name Immunglobuline stammt. Neben der Immunabwehr haben Globuline häufig eine Speicherfunktion. Andere, für die Pharmakokinetik von Arzneistoffen äußerst bedeutsame Proteine, sind die Albumine, wie Ovalbumin und Bovines Serum Albumin (BSA), welche zwar auch zu den globulären Proteinen, nicht jedoch zu den Globulinen gezählt werden. Eine weitere wichtige Gruppe der globulären Proteine sind Metalloproteine. Diese weisen ein komplexiertes Metallion auf, welches häufig essentiell für die katalytische Funktion des Proteins ist. Aber auch Transportproteine, wie das Hämoglobin mit seiner eisenträgenden Häm-Funktion oder das Myoglobin, welches ebenfalls eine Häm-Gruppe trägt, zählen hierzu. Allen globulären Proteinen ist gemeinsam, dass sie in wässrigen Salzlösungen löslich sind. Fibrilläre Proteine lösen sich dage-

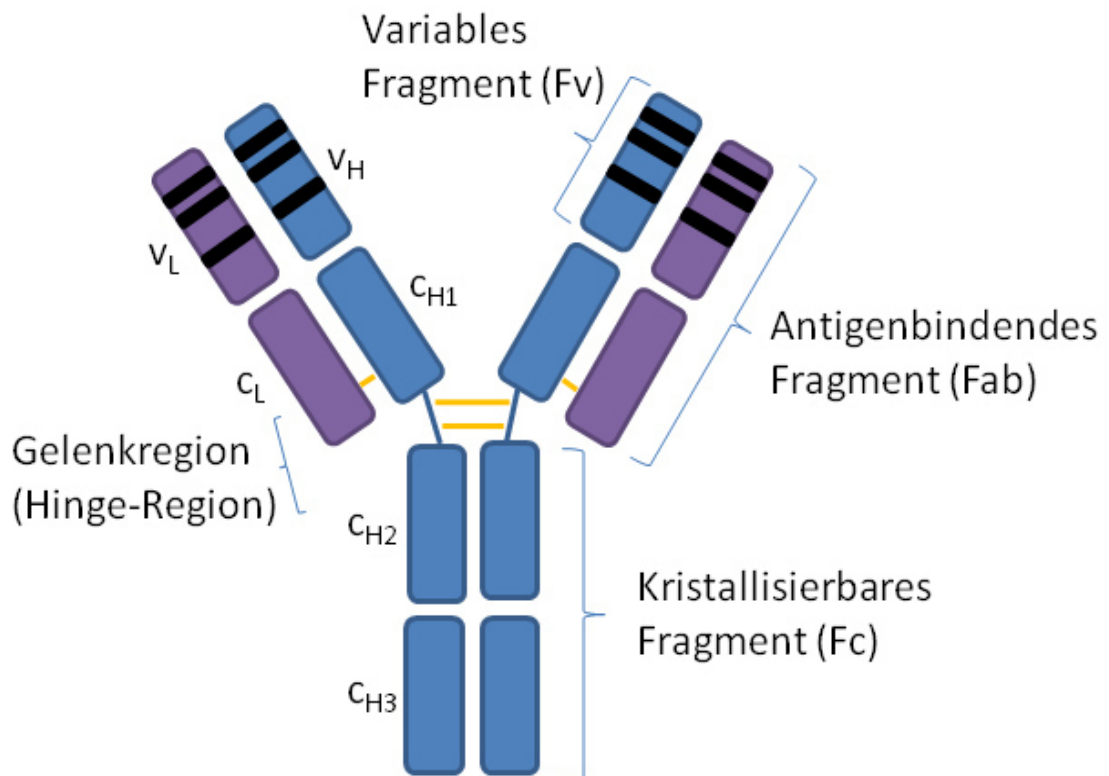
gen nur schwer in wässrigen Lösungen. Ein Beispiel sind hier die Keratine, aus denen Nägel und Haare bestehen. Diese sind für therapeutische Zwecke weniger interessant und werden daher hier nicht weiter berücksichtigt.

- Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen. In Abhängigkeit von ihrer Struktur weisen Proteine Instabilitäten gegenüber äußeren Einflüssen wie Hitze, großen Grenzflächen, extremen pH-Werten und Proteasen auf.
- Preis und Verfügbarkeit. Vor allem bei längeren Versuchsreihen, die große Mengen Probenmaterial beanspruchen, ist es sinnvoll wirtschaftlich vertretbar zu arbeiten. Das Modellprotein muss in größeren Mengen verfügbar sein, um chagentreues Arbeiten zu ermöglichen. Andernfalls steigt die Gefahr von Artefakten und Falschdeutungen. Obendrein sollte die Verfügbarkeit des Proteins beim Händler nicht eingeschränkt oder unsicher sein.

Nach diesen Gesichtspunkten wurden Ovalbumin, Bovines Serum Albumin (BSA), Myoglobin und Thyreoglobulin sowie ein therapeutischer Antikörper aus einer eingestellten klinischen Studie als Modellproteine verwendet (s. Kapitel 2.2).

2.2 Antikörper aus Studie

Aus einer klinischen Studie wurde uns nach dem Scheitern der Phase-2-Studie eine größere Menge monoklonaler Antikörper zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um einen humanisierten IgG1-Antikörper mit einem Gewicht von etwa 150 kDa (s. Abbildung 2.3). In dieser Arbeit soll dieser vereinfachend als MAB abgekürzt werden.



- Schwere Kette (heavy chain)
- Leichte Kette (light chain)
- Hochvariable Regionen (Complementary Determining regions, CDR)

Abbildung 2.3 - Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpermoleküls. Disulfidbrücken sind in gelber Farbe dargestellt. Die Bezeichnungen der Kettenteile sind in dieser Abbildung nur auf der linken Seite erfolgt. Dieselbe Bezeichnung gilt analog auch für die rechte Seite des Moleküls.

Die gezielte Gewinnung von bestimmten Antikörpern ist neben der Möglichkeit zum therapeutischen Einsatz außerdem relevant für diagnostische Methoden wie ELISA und Western Blot, aber auch für Schwangerschaftstests oder Immunoszintigraphie als medizinisch relevante Methoden. Je nach Verwendungszweck werden andere Anforderungen an den Antikörper gestellt. An dieser Stelle sollen jedoch die therapeutisch verwendeten Antikörper im Fokus stehen. Diese wurden früher gewonnen indem man möglichst großen Tieren (z.B. Ziege oder Pferd) über mehrere Monate mehrfach ein Antigen verabreicht hat, für welches man Antikörper benötigte.

Das Immunsystem des Tieres produziert Antikörper gegen das verabreichte Antigen. Dem Tier wird nach Feststellung einer hohen Antikörperkonzentration Blut entnommen und die Antikörpermoleküle werden abgetrennt, isoliert und gereinigt, bevor sie etwa als Antiserum gegen Botulismus verwendet werden können [42, S. 920–921]. Die auf diese Weise gewonnenen Antiseren enthalten viele verschiedene Antikörper (polyklonale Antikörper), welche sich gegen unterschiedliche Epitope des verabreichten Antigens richten. Bei der neueren Hybridoma-Technik werden i.d.R. Mäuse mit einem Antigen immunisiert. Als Folge werden vorerst auch hier polyklonale und auch polyvalente Antikörper erhalten. Um monoklonale Antikörper produzieren zu können, isoliert man die B-Lymphozyten aus der Maus und immortalisiert diese durch Hybridisierung mit einer Multiplen Myelom-Zelle [43]. Die auf diese Weise immortalisierten Hybridoma-Zellen werden mittels Western Blotting, durch Autoradiographie oder andere geeignete Verfahren [32, S. 74–75] auf den gesuchten Antikörper gescreent und nach erfolgreicher Identifizierung weiter kultiviert [23, S. 10–12]. Da die hierbei erhaltenen Antikörper murinen Ursprungs sind, werden sie bei Anwendung am Patienten häufig von dessen Immunsystem als fremd erkannt. Bei wiederholter Applikation kommt es zu überschießenden HAMA-Reaktionen. Um diese zu mindern, wurde nach Verfahren gesucht, welche eine Herstellung von humananalogen Molekülen erlauben. Da die Verwendung solcher Hybridomazellen jedoch kostengünstig und schnell durchführbar ist, werden sie bevorzugt zu analytischen Zwecken wie z.B. Immunoassays verwendet. Zur Produktion von therapeutischen Antikörpern bestehen heute drei Methoden, die hier zur Anwendung kommen:

1. die Phagen-Display-Technik, welche mit modifizierten Bakteriophagen und *E. coli* arbeitet,
2. die Verwendung von *human combinatorial libraries* (Gendatenbanken), welche es erlauben, Antikörper gezielt für bestimmte Antigene zu erzeugen, oder
3. die Verwendung von humanisierten Mäusen (auch: Xenomäuse, HuMab-Maus), in denen die Gene, welche Antikörper kodieren, durch humane Gene ersetzt wurden.

Letztere erlauben die Gewinnung von humanen Antikörpern mittels Hybridomtechnik [44, S. 64–67].

2.3 Gründe für das Scheitern einer Klinischen Studie

In der Einleitung wurde bereits der Anspruch an die Qualität von Arzneimitteln erwähnt. Neben den formellen Versagungsgründen einer Marktzulassung für Arzneimittel, etwa aufgrund von fehlenden Unterlagen bei der Antragstellung, sind Mängel in der Qualität, der Unbedenklichkeit und der Wirksamkeit des Arzneimittels Gründe für das Scheitern eines Arzneimittels bereits während einer klinischen Studie. Wenn für die beabsichtigte Indikation also kein therapeutischer Effekt vorliegt, kann der Arzneistoff nicht auf den Markt gelangen. Unbedenklich bedeutet, dass die Nebenwirkungen, die ein Arzneistoff verursachen wird, nicht die positive Wirkung überwiegen, also ein ausreichend positives Risiko-Nutzen-Verhältnis vorliegt. Die Qualität eines Arzneistoffes wird im Europäischen Arzneibuch durch Feststellen der Identität, des Gehaltes und der Reinheit gesichert. Für das qualitätsbedingte Scheitern einer Studie ist in aller Regel der Gehalt über den Zeitraum der Studie und die Reinheit entscheidend. Weist ein Arzneistoff zum Zeitpunkt der Produktion zunächst keine erkennbaren Nebenprodukte auf und hat somit eine Reinheit und einen Gehalt von 100 %, so kann sich bereits nach wenigen Stunden ein Großteil des Stoffes zersetzt haben oder es können sich sogar für den Patienten schadhafte Nebenprodukte bilden. Bei proteinogenen Arzneimitteln sind Aggregate ein häufiges Problem. Die meisten proteinogenen Arzneimittel werden intravenös appliziert, da sie den Verdauungstrakt nicht unzersetzt durchlaufen können. Die für den Körper fremden Bestandteile können vom Immunsystem erkannt werden. Dadurch kommt es zu einer Sensibilisierung von Mastzellen. Bei erneutem Verabreichen der gleichen Bestandteile kommt es zu einer massenhaften Degranulierung der Mastzellen mit Ausschüttung von diversen Entzündungsmediatoren, welche die allergietypischen Reaktionen wie Juckreiz, Ekzem, Blutdruckabfall bis hin zum möglicherweise tödlichen, anaphylaktischen Schock bewirken. Besonders häufig erfolgt diese Hypersensibilisierung gegenüber Proteinen, seltener gegenüber Kohlenhydraten. Je mehr sich das applizierte Protein von den körpereigenen Proteinen unterscheidet, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass es vom Immunsystem als fremd erkannt wird und eine Sensibilisierung erfolgt [19]. Das ist auch der Grund dafür, dass humanisierte Antikörper hergestellt werden. Diese weisen eine starke Ähnlichkeit zu den körpereigenen Antikörpern auf und werden daher seltener als fremd erkannt. Außerdem sind aggregierte Proteine, die aus einem Zusammenschluss mehrerer Moleküle bestehen, sog. Multimere, kritisch für die intravenöse Applikation [28]. Je größer ein

Protein ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, vom Immunsystem als fremd erkannt zu werden, sodass eine Sensibilisierung stattfindet [45].

2.4 Qualitätskontrolle

Bereits vor der klinischen Testung wird die Qualität von Arzneistoffen genauestens geprüft, aber auch nach Marktzulassung eines Präparates wird die Qualität fortlaufend kontrolliert. Es wird also während der gesamten "Lebenszeit" eines Arzneimittels, das meint hier die Zeit zwischen klinischer Erprobung bis zur Marktrücknahme, fortwährend die Qualität überwacht. Dies ist EU-weit im EudraLex, einer Sammlung von Verordnungen, Richtlinien und Empfehlungen, geregelt. Im Volume 4, dem EU-Good Manufacturing Practice (GMP)-Leitfaden findet sich im *Chapter 6, Part 1* die Definition von *Quality Control* (deutsch: Qualitätskontrolle):

"Quality Control is concerned with sampling, specifications and testing as well as the organisation, documentation and release procedures which ensure that the necessary and relevant tests are carried out, and that materials are not released for use, nor products released for sale or supply, until their quality has been judged satisfactory. Quality Control is not confined to laboratory operations, but must be involved in all decisions which may concern the quality of the product. The independence of Quality Control from Production is considered fundamental to the satisfactory operation of Quality Control." [46]

Diese Richtlinie wurde in der Verordnung über die Anwendung der Guten Herstellungspraxis bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen und über die Anwendung der Guten fachlichen Praxis bei der Herstellung von Produkten menschlicher Herkunft, kurz AMWHV, in deutsches Recht überführt. Dort heißt es in § 14 Prüfung unter anderem:

(3) Die zur Prüfung angewandten Verfahren sind nach dem jeweiligen Stand von Wissenschaft und Technik zu validieren. [...]

(5) Wurde die erforderliche Qualität festgestellt, sind die Produkte entsprechend kenntlich zu machen; bei zeitlicher Begrenzung der Haltbarkeit ist das Enddatum anzugeben.

(6) Ausgangsstoffe, Zwischen- und Endprodukte, die den Anforderungen an die Qualität nicht genügen, sind als solche kenntlich zu machen und abzusondern.

[...] [47]

Aus diesen Vorgaben lässt sich erkennen, dass die Qualitätskontrolle ein entscheidender Teil der Arzneimittelsicherheit ist und maßgeblich zur Sicherstellung der Qualität beitragen soll. Vor allem der EU-GMP-Leitfaden macht deutlich, dass Qualitätskontrolle hierbei nicht nur auf die Arbeiten im Labor beschränkt ist, sondern alle Bereiche tangiert, welche sich auf die Qualität auswirken. Einige dieser Bereiche werden in dieser Arbeit noch detaillierter diskutiert. Die gesetzlichen Vorgaben beziehen sich auf alle Arten von Arzneimitteln und sind stets verpflichtend für alle Personen und Unternehmen, die an der Herstellung und Prüfung von Arzneimitteln oder deren Ausgangsstoffen beteiligt sind.

3 Niedermolekulare Arzneistoffe

Eines der ersten gezielt synthetisch hergestellten Arzneimittel ist das para-(Acetylamino)phenol, welches unter dem deutschen Freinamen Paracetamol bekannt ist. Vor der Markteinführung von Paracetamol im Jahre 1956 standen mit Acetanilid und Phenacetin seit Ende der neunziger Jahre des neunzehnten Jahrhunderts zwei antipyretisch und analgetisch wirkende Arzneistoffe zur Verfügung. Phenacetin wurde im Jahre 1986 vom deutschen Markt zurückgezogen. Grund dafür waren aufgetretene Nierenschädigungen [43, S. 250, 48, S. 173]. Auch Acetanilid wurde aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen vom Markt genommen [49, S. 212]. Para-(Acetylamino)phenol wurde indes als Metabolit der damals bekannten Substanzen in Patientenurin entdeckt. Nach einiger Forschungsarbeit stellte sich die Verbindung als besser verträglich und wirksamer heraus als seine Vorgänger. Diese fast als empirisch zu sehende Arzneistoffforschung kann als einer der ersten Fälle von *me-too* Forschung gesehen werden.

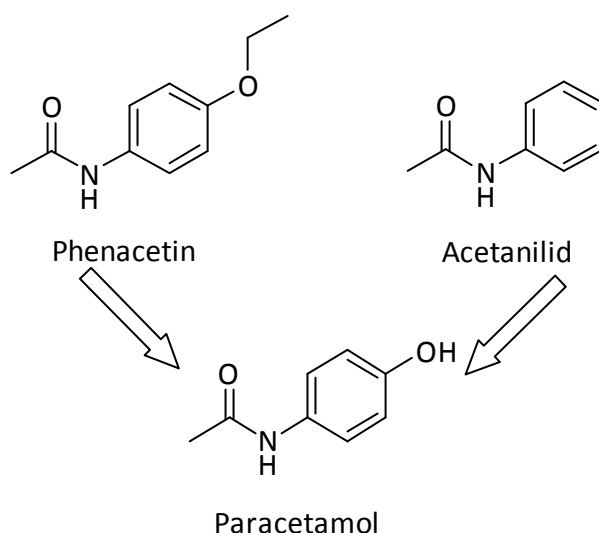
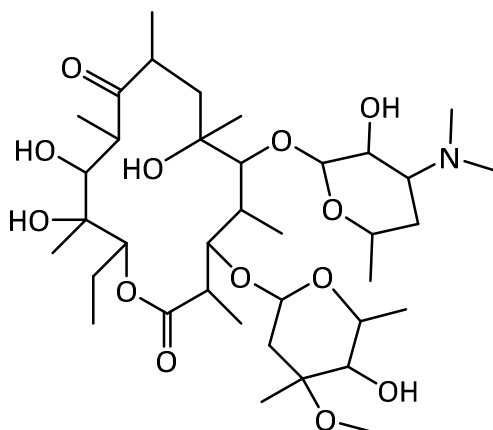


Abbildung 3.1 - Die schmerzstillenden und fiebersenkenden Wirkstoffe Phenacetin, Acetanilid und deren Metabolit bzw. *me-too*-Struktur Paracetamol.

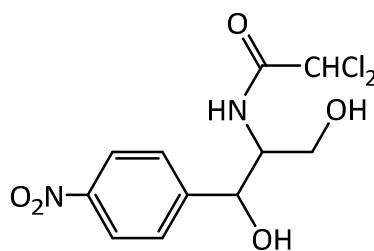
Bei der *me-too* Forschung werden bekannte Wirkstoffe geringfügig verändert und die so neu entstandenen Verbindungen auf Wirksamkeit und Verträglichkeit getestet (s. Abbildung 3.1). Die heute gängigste Methode zur Findung von neuen Arzneistoffen ist, neben dem gezielten Design von Antikörpern (Kapitel 2.2), das Arzneistoffmodellierung mittels Computersoftware. Nachdem die Zielstruktur durch Genom-, Transkriptom- oder Proteomanalytik ausgemacht wurde, wird diese Zielstruktur (Rezeptoren, Ionenkanäle, Enzyme) auf molekularer Ebene

nach möglichen Angriffspunkten untersucht [50, S. 9–10]. Ziel dabei ist es, eine möglichst starke Wechselwirkung an oder in der Nähe von einem für die Funktion der Zielstruktur essentiellen Bereiches zu erzielen. Eine Variante dieses Verfahrens orientiert sich an den natürlichen Liganden der Zielstruktur oder an bereits vorhandenen Wirkstoffstrukturen [31, S. 25]. Handelt es sich bei der Zielstruktur um ein Enzym, werden häufig die natürlichen Liganden des Enzyms nachgeahmt. Die Arzneistoffmoleküle konkurrieren mit den natürlichen Liganden um Bindestellen im aktiven Zentrum des Enzyms oder binden kovalent (dauerhaft) an dieses, ohne vom Enzym umgesetzt zu werden. Auf diese Weise hemmen sie die Funktionalität des Enzyms. Neben diesen beiden Mechanismen der Enzymhemmung gibt es noch weitere. Diese sollen jedoch in dieser Arbeit nicht weiter erläutert werden.

Auch einige Antibiotika wirken durch Enzyminhibition. Dadurch kann z.B. erreicht werden, dass die Proteinsynthese in den Bakterien zum Erliegen kommt - die Bakterien können sich nicht weiter vermehren. Ein bekannter Vertreter dieses Wirkmechanismus ist das Chloramphenicol. Chloramphenicol, welches ursprünglich aus einer *Streptomyces*-Art gewonnen wurde, kann seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts vollsynthetisch hergestellt werden [51]. Auch für Erythromycin, ein Makrolidantibiotikum, wurde bereits 1981 ein Syntheseweg veröffentlicht [52]. Anders als Chloramphenicol wird dieses jedoch noch heute aus einer Kultur von *Streptomyces erythreus*-Bakterien isoliert, in denen die Verbindung das erste Mal nachgewiesen werden konnte [53]. Der Grund hierfür ist, dass die Herstellung von Erythromycin mittels Bakterienkultur deutlich wirtschaftlicher ist als die Vollsynthese [54]. Je komplexer die Struktur des Moleküls, desto weniger effizient ist die synthetische Gewinnung, da mit jedem zusätzlichen Syntheseschritt die Gesamtausbeute geringer ausfallen wird. Ein Vergleich der beiden angesprochenen Verbindungen Erythromycin und Chloramphenicol macht dies deutlich (s. Abbildung 3.2). Wie bereits in Kapitel 2 beschrieben wurde, liegen biotechnologisch gewonnene Arzneistoffe in der Regel als heterogenes Gemisch vor. Bei Erythromycin handelt es sich daher ebenfalls um ein Gemisch aus mehreren Verbindungen, auf welche weiter unten noch eingegangen wird.



Erythromycin A
Chemical Formula: $C_{37}H_{67}NO_{13}$
Exact Mass: 733,46



Chloramphenicol
Chemical Formula: $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$
Exact Mass: 322,01

Abbildung 3.2 - Erythromycin und Chloramphenicol. Die angegebenen Daten wurden mit Chemdraw 13.0 ermittelt.

3.1 Wirkstoffe

3.1.1 Keine Wirkung ohne Nebenwirkung!

Wie bereits in Kapitel 3 angesprochen, sollen Arzneistoffe in der Lage sein, möglichst effizient chemische Wechselwirkungen mit der Zielstruktur einzugehen. Durch Genomanalyse werden Zielstrukturen ausfindig gemacht, passende Wirkstoffe mittels *molecular modelling* am Computer designet, synthetisiert und anschließend ihre Wirksamkeit und Toxizität untersucht. Bei dieser Art der Wirkstofffindung lässt sich jedoch nicht mit Sicherheit sagen, dass der Wirkstoff spezifisch für das gewählte Target ist, da er nur auf dieses eine Target hin entwickelt wurde. Je unspezifischer der Wirkstoff ist, desto mehr Nebenwirkungen wird dieser auslösen [31, S. 8]. Je höher hingegen die Affinität eines Wirkstoffes zu einer Zielstruktur ist, desto selektiver ist er in der Regel auch [31, S. 11] und zeigt so potentiell weniger Nebenwirkungen. Das tatsächliche Nebenwirkungspotential muss in Zell- bzw. Tierversuchen und klinischen Studien erprobt werden.

Bei Arzneistoffen, die genaugenommen ein Gemisch mehrerer analoger Verbindungen darstellen, wie es bei biotechnologisch hergestellten Wirkstoffen häufig der Fall ist, haben die einzelnen Stoffe unterschiedlich große Affinitäten zur Zielstruktur. In einigen Fällen sind die Wirksamkeit und das Nebenwirkungspotential aller im Arzneimittel auftauchenden Strukturen bekannt. In der Regel sind diese jedoch weniger genau untersucht. Solchen Verbindun-

gen wird dann generell ein gewisses toxisches Potential unterstellt, weswegen der Anteil der nicht qualifizierten Substanzen im fertigen Arzneimittel gesetzlich limitiert ist. Die *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), hat in der Guideline ICH Q3A Grenzwerte hierzu vorgeschrieben. Diese wurden in das EudraLex übernommen und sind daher EU-weit gültig. Auch der Gehalt an toxikologisch qualifizierten, nicht wirksamen Analoga der wirksamen Komponente des Gemisches, sowie der Gehalt an Abbauprodukten, die während der Lagerung entstehen, sind in ihrer Konzentration im Arzneimittel begrenzt [55]. Diese Grenzen dürfen während der Laufzeit eines Medikamentes nicht überschritten werden, was sich jedoch vor allem bei individuell gefertigten Rezepturarmitteln, aufgrund der Vielfältigkeit der Trägerstoffe, die verwendet werden, als schwierig erweist. Grundlagen für die Zubereitung halbfester Arzneimittel (Salben, Cremes, Gele) unterscheiden sich hinsichtlich Lipophilie bzw. Wassergehalt und Phasenlage, sowie im pH-Wert der wässrigen Phase. Zusätzlich enthaltene Konservierungsstoffe, Detergentien und sonstige Hilfsstoffe können mit den Arzneistoffen reagieren und so zu vorzeitigem Verfall der Zubereitung führen. Der Verfall ist hierbei primär bedingt durch 1) die Abnahme an wirksamer Substanz und 2) durch so entstehende, möglicherweise toxische Abbauprodukte. Darüber hinaus kann eine Zubereitung untauglich werden, ohne dass wirksame Anteile beeinträchtigt werden, indem die galenische Struktur ganz oder teilweise verloren geht. So führt beispielsweise eine Phasentrennung von lipophilen und wässrigen Bestandteilen der Grundlage ebenso zu einem Verfall der Zubereitung. Die Überprüfung der Qualität einer ausgewählten, halbfesten Arzneiform wird in Kapitel 5 besprochen.

3.1.2 Stabilitäten

Der Begriff der Stabilität lässt sich schwerlich scharf definieren. Die ICH hat in der *Stability Guideline* ICH Q1A(R2) die Stabilität als Beständigkeit einer Substanz oder einer Zubereitung gegenüber Umwelteinflüssen wie Temperatur, Feuchtigkeit und Licht beschrieben [56]. Bei der Beurteilung der Stabilität lässt sich der Wirkstoff allein, also ohne Hilfsstoffmatrix, oder als fertiges Arzneimittel betrachten. Die Stabilität des Arzneimittels kann man wiederum im Bulk betrachten oder in der Primär- oder Sekundärverpackung. Bei manchen Medikamenten unterscheidet sich außerdem die Konstitution des Medikamentes während der Lagerung der

Anwendungsform. Dies ist der Fall bei Trockensäften oder gefriergetrockneten Parenteralia. Arzneiformen wie Trockensäfte und halbfeste Zubereitungen haben nach Anbruch durch den Patienten eine verkürzte Haltbarkeit, da Kontaminationen durch Mikroorganismen sowie Oxidation durch Luftsauerstoff drohen. Man spricht hierbei von der Anbruchstabilität. Die Stabilität gegenüber bestimmten Einflussfaktoren kann ebenfalls getrennt betrachtet werden, etwa die Photostabilität oder die Empfindlichkeit gegenüber erhöhter Luftfeuchte und erhöhten Temperaturen.

Die Stabilität von wirksamen Inhaltsstoffen (Wirkstoffe, Konservierungsmittel, Adjuvantien) ist stets bedingt durch deren chemische und physikalische Eigenschaften sowie durch die ihrer Umgebung. So gilt Metronidazol laut Kommentar zum Europäischen Arzneibuch als photolabile Substanz [57]. Auch der Feststoff in Reinform ist vor Licht geschützt zu lagern [58]. Setzt man eine neutral gepufferte Metronidazollösung starker UV-Strahlung aus, kommt es zur deutlichen Abnahme an intaktem Wirkstoff. Setzt man hingegen eine ethanolische Lösung dieser Strahlungsdosis aus, so ist keine Abnahme zu beobachten (s. Kapitel 5). Das hydrolyselabile Erythromycin zählt mit einem logP von 3,06 [59] zu den lipophilen Arzneistoffen, es löst sich daher besser in nicht-wässrigen, lipophilen Matrices, wodurch es vor einer Zersetzung durch Hydrolyse geschützt ist (s. Kapitel 5).

Wie bei Proteinen auch, besteht bei niedermolekularen Arzneistoffen ein enger Zusammenhang zwischen Stabilität und Umgebungs-pH. Praktisch alle Substanzen weisen ein gewisses Stabilitätsoptimum auf. Dieses unterscheidet sich in Breite und Lage von Substanz zu Substanz. Bei Herstellung eines Fertigarzneimittels wird dieses für die Wahl der Hilfsstoffmatrix und den Applikationsweg berücksichtigt. Problematisch ist es, wenn ein Therapiekonzept die Kombination zweier Substanzen verlangt, deren Stabilitätsoptima keine Schnittmenge aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist die Kombination von Erythromycin und Metronidazol zur Therapie der Rosacea. Diese Inkompatibilität wurde aufgrund ihrer therapeutischen Relevanz und der anspruchsvollen Galenik für weitere Untersuchungen ausgewählt (s. Kapitel 5).

3.2 Analytik von Arzneistoffen

Die Analytik von Arzneimitteln beginnt weit bevor deren Produktion beendet ist. Wie die fertigen Arzneimittel auch, werden bereits deren Ausgangsstoffe auf Identität, Reinheit und Gehalt geprüft. Für die Feststellung dieser Punkte muss die zur Prüfung verwendete Metho-

de entsprechend geeignet sein. Man spricht hier von validierten Methoden. Die Eignung einer Methode ist einerseits festgelegt durch das Arzneibuch, andererseits durch die ICH-*Guideline* Q2(R1).

Im Arzneimittelgesetz wird das Arzneibuch als rechtlich geltendes Referenzwerk angeführt (§55 Arzneibuch). Dieses enthält "*anerkannte pharmazeutische Regeln*", die zur Prüfung und Feststellung der Qualität von Arzneistoffen und Arzneimitteln herangezogen werden sollen [1]. Die im Arzneibuch aufgeführten Methoden gelten als validiert im Sinne der ICH Q2 [60]. Sie werden von den zuständigen Behörden anerkannt. Wird von diesen Methoden abgewichen, muss die angewandte Methode vollständig validiert und somit auf Tauglichkeit geprüft werden. Je nach Zweck bzw. Art der analytischen Prüfung variiert der Umfang der Validierung der Methode [60]. Nach der ICH-*Guideline* Q2(R1) wird für die Feststellung der Identität einer Substanz (Identitätsprüfung) ausschließlich eine hohe Selektivität der Methode verlangt. Eine besonders gute Reproduzierbarkeit der erhaltenen Signalintensität ist nicht nötig, da in diesem Fall keine quantitative Aussage erforderlich ist. Die quantitative Prüfung auf Verunreinigungen hingegen setzt neben der Selektivität der Methode auch eine gute Präzision der erhaltenen Daten voraus. Die Präzision muss sowohl innerhalb einer Messreihe (Wiederholungen erfolgen unter denselben Bedingungen), als auch innerhalb eines Labors unter vergleichbaren, nicht aber denselben Bedingungen gegeben sein. Außerdem muss die Bestimmungsgrenze bekannt sein und diese unterhalb des gemessenen Wertes liegen. Die Linearität der Kalibrierfunktion sollte gegeben sein und muss den gemessenen Wert abdecken. Falls kein linearer Zusammenhang besteht, muss ein anderer funktionaler Zusammenhang zwischen Probe und analytischem Signal bestehen. Erst dann kann die geforderte Richtigkeit der Werte angenommen werden. Die Richtigkeit (englisch: *Accuracy* oder *Trueness*) wird lt. ICH angesehen als das Ausmaß der gegenseitigen Übereinstimmung des gemessenen Wertes mit einem anerkannten Referenzwert oder einem als richtig angenommenen Wert. Sie kann außerdem durch das Verwenden einer orthogonalen Analysenmethode überprüft werden. Zur Robustheit einer Methode gegenüber äußeren Einflüssen macht die ICH keine genauen Vorschläge, es wird jedoch empfohlen, für jede Validierung einer Methode individuell zu prüfen ob und inwiefern die Robustheit festgestellt werden muss. Nachdem die dem Prüfungszweck angemessenen Parameter festgestellt wurden, können belastbare Daten erhalten werden, welche die Beurteilung der Qualität eines Stoffes oder eines Arzneimittels

zulassen. Durch die Validierung der Methode werden zufällig erzeugte Artefakte weitestgehend vermieden. Der Erhalt belastbarer Daten, unter dem Ausschluss von Zufall, ist das Ziel einer jeden analytischen Untersuchung.

Neben diesen Ansprüchen soll eine Analysenmethode auch möglichst ressourcenschonend und zeitsparend arbeiten. In den letzten Jahren hat sich in der lösemittelverbrauchenden Flüssigchromatographie, aber auch in anderen Bereichen, gar der Begriff der grünen Analytik etabliert [61–64]. Ziel einer grünen Analytik ist die weitgehende Vermeidung von Lösemittelabfall, etwa durch Recycling von verwendetem Lösemittel, Methodentransfers in der HPLC auf stationäre Phasen, welche Trennungen mit erhöhtem Wasseranteil oder geringerem Eluentenvolumen ermöglichen, oder durch den Einsatz von superkritischem CO₂ als Eluent in der HPLC. Ansätze zur ökonomischen Anwendung der HPLC lieferte L. Kaminski in seiner Dissertationsschrift [7], in welcher er sich mit dem ökonomischen und effizienten Einsatz der HPLC auseinandersetzte. Auch in dieser Arbeit wurde Wert auf den sparsamen Umgang mit Ressourcen gelegt (s. Kapitel 4.1.4.3), stellte jedoch keinen Schwerpunkt dar.

3.3 Keine Validierung ohne Qualifizierung; ohne Qualifizierung keine Qualität

Bevor eine Methode validiert werden kann, muss das analytische Instrument qualifiziert sein. Erst durch die Qualifizierung wird gezeigt, dass ein Instrument zuverlässig und reproduzierbar arbeitet bzw. den festgelegten Spezifikationen entspricht.

Die Qualifizierung der in dieser Arbeit verwendeten HPLC-Instrumente erfolgte nach einem Arbeitsgruppen-internen Systemtest. Durch diesen wurden die Linearität, Drift und Rauschen des Detektors sowie die Linearität der Pumpe bei verschiedenen Flussraten und die Injektorlinearität geprüft (s. Kapitel 8.1.3.1). Da diese Qualifizierungsarbeiten Zeit und Ressourcen bedürfen, wurde nach Feststellung der Tauglichkeit die Funktionskontrolle im Rahmen der Laborroutine durch Referenzproben und Blank-Injektionen kontrolliert. Eine teilweise Wiederholung der Qualifizierung sollte nur dann erfolgen, wenn an den geprüften Bauteilen manipuliert wurde, etwa nach einem Wechsel der Pumpendichtung würde die Flussratenlinearität überprüft werden. Die erneute Testung der Injektorlinearität im vollen Umfang macht hierbei nur wenig Sinn.

Die anderen in dieser Arbeit verwendeten Instrumente: das Infrarotspektrometer und das Atomspektrometer (s. Kapitel 8), wurden neben der Forschung außerdem für den Ausbildungsbetrieb genutzt und konnten auf diesem Wege permanent überwacht werden. Da stets Proben definierter Zusammensetzung und bekannten Gehalts an die Studierenden ausgegeben und vermessen wurden, konnten so Trends und Abweichungen einfach beobachtet werden.

Erst nach erfolgter Kontrolle der Tauglichkeit des verwendeten Systems können die benötigten Methoden etabliert und validiert werden. Die auf diese Weise überprüften Methoden sind in der Lage belastbare Daten zu liefern. Nur belastbare Daten können wiederum die Qualität von den untersuchten Arzneistoffen garantieren.

4 HPLC

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit ist durch die Arbeit mit oder am HPLC-Instrument selbst entstanden. Die Details der grundsätzlichen Gerätetechnik sollen hier jedoch nur soweit für die Darstellung der Resultate notwendig dargestellt werden. Für eine weitreichende Einführung in die Thematik sei auf die Dissertationsschrift von L. Kaminski aus dem Arbeitskreis Wätzig [7] sowie auf gängige Lehrbücher verwiesen [65, 66].

4.1 Prinzip der HPLC

Das grundsätzliche Prinzip der Hochleistungs-Flüssigchromatographie hat sich seit der Erfindung der Säulenchromatographie nur wenig geändert. M. Tswett, der als Begründer der Chromatographie gilt, hat sich wohl bei seiner Veröffentlichung mit dem Titel „Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls“ in den Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft im Jahre 1906 [67], kaum träumen lassen, dass sich die (Flüssig-)Chromatographie zu einer der bedeutsamsten Analysetechniken mit einem eigenen Forschungszweig entwickeln würde. Tswett verwendete eine mit festen Sorbentien gefüllte Glassäule. Er beschrieb die Sorbentien als „in dem betreffenden Lösungsmittel unlösliche pulverförmige Körper [...] welche chemisch indifferent sind und sich zugleich in eine möglichst feine Form bringen lassen“. Auf diese Säule gab er zunächst chlorophyllhaltige (farbige) Lösungen und spülte so lange mit reinem Lösemittel (früher: Lösungsmittel) nach, bis die gewünschte chromatographische Trennung erreicht war. Tswett beließ die Stoffe jedoch auf der Säule. Er zog das Lösemittel durch "positiven oder negativen Druck" vom Präparat ab und schob die Sorbentiensäule aus ihrer Form heraus. Diese zerteilte er mit dem Messer in unterschiedliche Probenzonen, um diese genauer zu untersuchen. Heute spricht man bei dieser Art von Trennung von einem inneren Chromatogramm, wie es auch bei der Dünnschichtchromatographie erhalten wird. Dabei verlässt die untersuchte Substanz nicht das feste Sorbens. Im Jahr 1941 erkannten Martin und Synge die Notwendigkeit einer möglichst geringen Partikelgröße der festen Sorbentien und hohen Druck, um die Lösemittel durch die stationäre Phase zu pressen und legten damit den Grundstein für die moderne Chromatographie [66, S. 5] bzw. [68]. Erst weitere gut zwanzig Jahre später wurden, nach der Entwicklung der notwendigen Detektoren, die ersten äußeren Chromatogramme erzeugt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Analysesubstanzen nach Verlassen der

Trennsäule detektiert [69, S. 1]. Auch heute noch werden Substanzgemische auf festen Sorbentien mittels Lösemitteln getrennt, wie Tswett es Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts schon beschrieben hat. In dieser Arbeit soll der Begriff der stationären Phase für Sorbentien verwendet werden. Da die zur chromatographischen Trennung verwendeten Lösemittel auch anorganisch sein können (z.B. wässrige Pufferlösungen), bei Lösemitteln jedoch häufig an organische Lösemittel gedacht wird, sollen die hierzu verwendeten Flüssigkeiten als mobile Phase oder Eluent bezeichnet werden. Ein zentraler Unterschied zu dem von Tswett in [67] genutzten Verfahren ist heute das Material und die Qualität der verwendeten Partikel der stationären Phasen.

4.1.1 Qualität der Partikel

Maßen die Partikel in den Anfängen der Chromatographie noch bis zu 50 μm im Durchmesser [69, S. 1], kamen in den vergangenen Jahren immer geringere Partikeldurchmesser in Trennsäulen zum Einsatz. Momentan bewegen sich die kleinsten Partikel im sogenannten sub-2- μ Bereich (*sub two micron*-Bereich), also mit Durchmessern unter 2 μm . Der Grund hierfür liegt in der hierdurch vergrößerten Oberfläche der stationären Phase. Die chromatographische Trennung geht bei Adsorptionschromatographie auf vermehrte Adsorption und Desorption der Substanzen auf der stationären Phase zurück. Diese Adsorption wird, in Abhängigkeit der chemischen Struktur von Substanz und stationärer Phase, von van der Waals-Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen oder ionischen Interaktionen bestimmt. Um zwei Substanzen voneinander zu trennen, müssen diese sich daher in ihren chemischen oder physikalischen Eigenschaften unterscheiden. Je größer der Unterschied der Anziehungskräfte, die zwischen Substanzen und stationärer Phase wirken ist, desto einfacher lassen sich in der Regel auch die Substanzen chromatographisch trennen. Je größer die Oberfläche innerhalb einer Trennsäule ist, desto mehr mögliche Wechselwirkungspunkte (Trennstufen) hat daher die zu trennende Substanz mit der stationären Phase. Eine Trennstufe steht für die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Substanz und stationärer Phase. Je mehr es hiervon gibt, desto höher wird die Auflösung R_s der Trennung.

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}}$$

Formel 4.1 - Formel zur Ermittlung der Auflösung R_S aus chromatographischen Daten. t_{R1} ist die Retentionszeit der früher im Chromatogramm erscheinenden Substanz, t_{R2} die der später erscheinenden. w_{b1} und w_{b2} sind die Basisbreiten der entsprechenden Signale.

Der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Trennstufen N und der Auflösung R_S ist in Formel 4.2 dargestellt.

$$R_S = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) * \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) * \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right)$$

Formel 4.2 - Gleichung für die Auflösung mit α für den Trennfaktor und k für den Retentionsfaktor.

Der Retentionsfaktor k ergibt sich aus dem Quotienten der Nettoretentionszeit einer Substanz zu der Totzeit im Chromatogramm. Der Trennfaktor α ergibt sich wiederum aus dem Quotienten der Retentionsfaktoren zweier Peaks im Chromatogramm. Er wird dabei stets so berechnet, dass sich Werte größer eins ergeben. Für eine Erhöhung der Auflösung um den Faktor 2, bedarf es der vierfachen Anzahl an Trennstufen (s. Formel 4.2). Ein direkter Weg die Anzahl der Trennstufen zu erhöhen, geht über die Verlängerung der Säule.

$$N = \frac{L}{H}$$

Formel 4.3 - Formel über den Zusammenhang von Trennstufenzahl N , Säulenlänge L und Trennstufenhöhe H .

In Formel 4.3 ist der Zusammenhang zwischen Säulenlänge L , Trennstufenzahl N und der Trennstufenhöhe H dargestellt. Eine Verlängerung der Säule führt also proportional zu einer Erhöhung der Trennstufenzahl. Dies lässt sich jedoch nur bedingt praktisch umsetzen, da eine Verlängerung der Säule, neben erhöhten Analysenzeiten zu vermehrter Diffusion und somit zu einer schlechteren Auflösung führt. Ebenso ist mehr Druck notwendig um den Eluenten durch das Säulenbett zu treiben. Man versucht daher die Trennstufenzahl auf anderen Wegen zu erhöhen.

So ist die Trennstufenzahl eine Funktion des Partikeldurchmessers. Sie nimmt proportional zur Länge der Säule und umgekehrt proportional zum Partikeldurchmesser zu [70, S. 394]

(s. Formel 4.4) und kann daher durch eine Verkleinerung der Partikeldurchmesser gesteigert werden.

$$N = \frac{L}{d_p}$$

Formel 4.4 - Zusammenhang zwischen Partikelgröße der stationären Phase und der Trennstufenzahl.

Dividiert man die Trennstufenhöhe durch den Partikeldurchmesser d_p erhält man die reduzierte Bodenhöhe h (s. Formel 4.5). Sie ist eine Maßzahl für die Qualität der Säulenpackung und ermöglicht einen Vergleich von Säulen mit unterschiedlichen Partikelgrößen der stationären Phase. Gut präparierte Säulen weisen generell eine reduzierte Bodenhöhe von 2 bis 3 auf [71].

$$h = \frac{H}{d_p}$$

Formel 4.5 - Formel zur Ermittlung der reduzierten Bodenhöhe h . Sie stellt ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer Trennsäule, unabhängig der Partikelgröße der stationären Phase dar.

Die Verringerung der Partikelgrößen führt, wie oben angesprochen, zu einer Erhöhung der Trennstufenzahl. Aber auch die Beschaffenheit des Säulenbettes ist von Bedeutung. Formel 4.6 gibt an, welche Faktoren den Druck in der Säule beeinflussen.

$$P = \frac{\eta * u * L}{K^0 * \pi r^2 * d_p^2}$$

Formel 4.6 - Druckformel für gepackte Säulen nach R. E. Major in LCGC Europe (2008) Vol 21(5). Mit η für die Viskosität des Eluenten, u für die Fließgeschwindigkeit, K^0 für die spezifische Permeabilität der stationären Phase, r für den Säuleninnenradius und d_p für den Partikeldurchmesser [72].

Eine Verringerung der Partikelgröße führt demnach zu einer Vergrößerung des Druckes im Quadrat. Eine hohe Auflösung ist demnach an eine Erhöhung des Druckes geknüpft. Eine Verkürzung der Säulen kann den Druck zwar senken [73], jedoch fällt damit auch die Trennstufenzahl.

Laut Formel 4.6 lässt sich über die spezifische Permeabilität des Materials der stationären Phase K^0 der Druck erniedrigen. Daher wurden Säulenbette entwickelt, die aus monolithischen Silikakristallen von hochporöser Struktur bestehen. Eine weitere bedeutende Entwicklung der jüngeren Vergangenheit stellen sphärische Partikel mit impermeablem Kern dar. Beide weisen eine verbesserte Trenneffizienz durch eine geringere Trennstufenhöhe auf als

herkömmliche vollporöse Partikel. Diese Materialien werden weiter unten noch genauer besprochen (s. Kapitel 4.1.2.2 und 4.1.2.4). Zur Senkung des notwendigen anzulegenden Druckes wird des Weiteren auch die Erniedrigung der Eluentenviskosität durch eine Erhöhung der Temperatur mittels Säulenofen praktiziert.

Zum Erreichen einer möglichst hohen Trennstufenzahl ist der mittlere Teilchendurchmesser d_p weniger bedeutsam als eine enge Partikelgrößenverteilung (s. Abbildung 4.1). Nur so kann eine möglichst dichte Kugelpackung erreicht werden. Silikagel-basierte Partikel werden durch Kristallisation aus Lösungen gezüchtet und dann durch Siebprozesse nach Größe selektiert, damit nur Partikel einer Größe zur Säulenpackung verwendet werden.

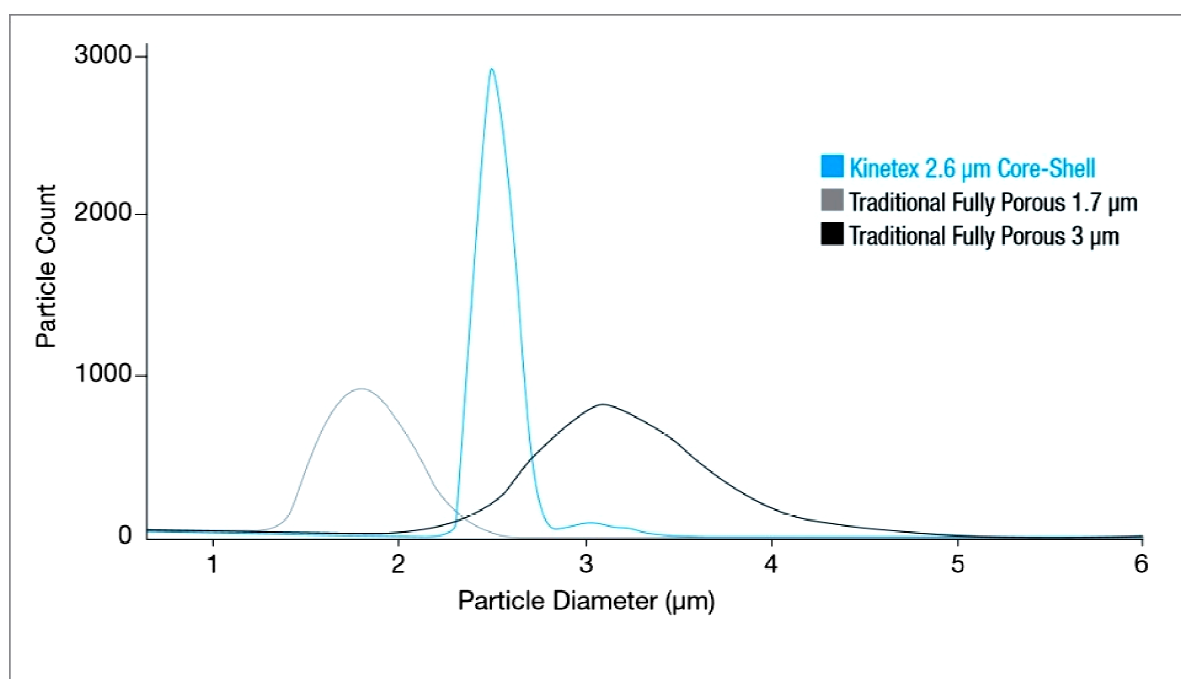


Abbildung 4.1 - Darstellung zur Partikelgrößenverteilung aus dem Phenomenex *Chromatography Product Guide* 15/16 [74]. Eine engere Partikelgrößenverteilung führt zu einer höheren Trennstufenzahl und so zu einer erhöhten Trenneffizienz.

Für eine hohe Effizienz der Säulenpackung muss es sich bei den gezüchteten Partikeln um möglichst perfekt sphärische, also kugelförmige, Partikel handeln. Je uniformer dies gelingt, desto dichter wird die Kugelpackung und desto mehr Trennstufen entstehen in der Säule. Eine homogene Partikelgrößenverteilung wirkt sich außerdem auf die Eddy-Diffusion aus. Die Eddy-Diffusion wird auch als Mehrwegs-Diffusion bezeichnet (s. Abbildung 4.2). Durch eine homogene Packung und eine schmale Partikelgrößenverteilung wird die Eddy-Diffusion geringer, wodurch auch die Trennstufenhöhe H geringer ausfällt und die Trennstufenzahl N

steigt. Für Kapillarsäulen, die ein offenes Lumen aufweisen, spielt die Eddy-Diffusion keine Rolle. Solche Trennsäulen werden jedoch in der Regel nur in der Gaschromatographie verwendet.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Formel 4.7 - van-Deemter-Gleichung. H ist die Trennstufenhöhe, A steht für die Eddy-Diffusion (Mehrwegsdiffusion), B/u stellt den Term für die Longitudinaldiffusion und C*u den Term für den Massenübergang dar.

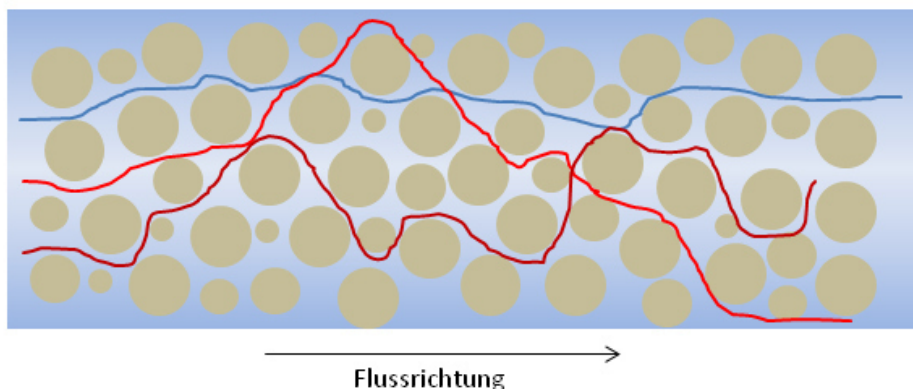


Abbildung 4.2 - Darstellung der Wege des Analyten durch ein Säulenbett. Die unterschiedlich langen Wege verursachen bei der Detektion der Substanz eine Signalverbreiterung.

Formel 4.7 und Abbildung 4.3 zeigen die van-Deemter-Gleichung nach [75] mit A für die Eddy-Diffusion, B für die Longitudinaldiffusion, C für den Massenübergang (auch: Stoffaustausch, Massentransfer) und u für die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase. Die Longitudinaldiffusion wird bei hohen Fließgeschwindigkeiten weniger bedeutsam für die Trennstufenzahl, da diese zeitabhängig abläuft. Der Stoffaustausch ist die Ursache für die Trennung in der Chromatographie und beschreibt die Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Analysensubstanz. Weil die Gleichgewichtseinstellung für langsamere Flussraten häufiger ablaufen kann, erhält man für niedrigere Flussraten kleinere Trennstufenhöhen. Laut Knox nimmt dabei, anders als in der van-Deemter-Gleichung, die Bandenverbreiterung bedingt durch die Eddy-Diffusion mit der dritten Wurzel der Flussrate zu [71].

$$H = A * u^{\frac{1}{3}} + \frac{B}{u} + C * u$$

Formel 4.8 - Knox-Gleichung. Die Eddy-Diffusion wird hierbei in Abhängigkeit zur Flussrate gestellt.

Wie Formel 4.8 zeigt, ist die van-Deemter-Gleichung in Teilen widerlegt bzw. ergänzt worden

und spiegelt nicht die vollständigen Abläufe während einer chromatographischen Trennung wieder. Trotz der Überholung durch Knox im Jahre 1999 und erneut durch Guichon und Gritti im Jahre 2006, beschreibt die van-Deemter-Gleichung nach wie vor korrekt die Richtung des Einflusses der Flussrate auf Diffusionsprozesse und die daraus resultierende Trennstufenhöhe [76].

Für den Parameter H findet man häufig das Kürzel HETP. Dieses steht für die englische Übersetzung des "Höhenäquivalents eines Theoretischen Bodens". An Abbildung 4.3 kann man ersehen, dass die Trennstufenhöhe bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit minimal wird.

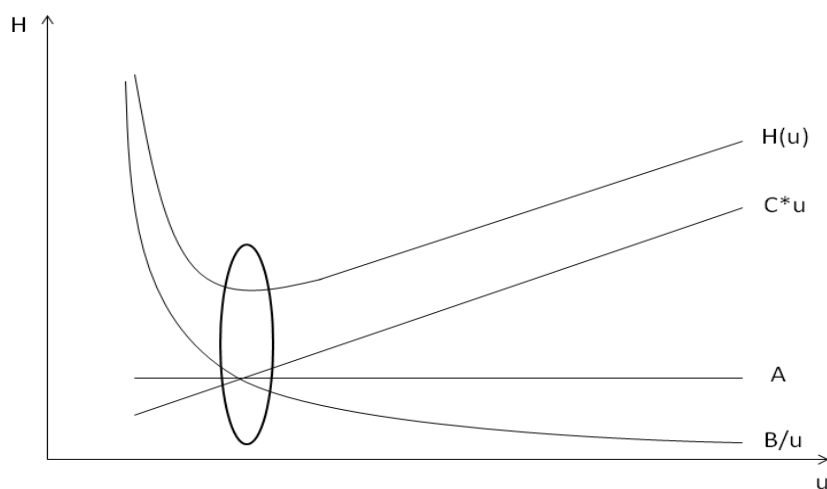


Abbildung 4.3 - Darstellung der van-Deemter-Gleichung in Plot-Form. Die Ellipse zeigt den Bereich der idealen Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase an. In diesem Bereich ist die Trennstufenhöhe minimal und damit die Trennstufenzahl maximal.

$$A = 2\lambda * d_p$$

Formel 4.9 - Ausdehnung der Eddy-Diffusion. λ steht für den Packungsfaktor, d_p ist der Partikeldurchmesser.

Formel 4.9 stellt die Ausdehnung der Eddy-Diffusion dar. λ ist ein Packungsfaktor und d_p der Partikeldurchmesser. Der Packungsfaktor wird klein für kugelrunde, symmetrische Partikel und eine enge Größenverteilung. Je kleiner und homogener die Partikel sind, desto mehr Trennstufen liegen vor.

Dies wird jedoch begrenzt durch den anzulegenden Druck (wie weiter oben beschrieben). Aktuelle Modelle gewöhnlicher HPLC-Anlagen erreichen Drücke von bis zu 400 bar, jedoch erschienen in den vergangenen Jahren vermehrt Geräte, die bei bis zu 600 bar arbeiten. Der in dieser Arbeit verwendete Gerätetyp verwendet zum Großteil Bauteile, die für bis zu 600

bar ausgelegt sind [77], jedoch ist die Pumpe nur bis zu einem Druck von 400 bar zugelassen. Ab 1000 bar spricht man im Allgemeinen von *ultra high performance liquid chromatography* (UHPLC). Diese extrem hohen Drücke ermöglichen den Einsatz von Säulen mit sehr geringer Partikelgröße und kleinem Säulendurchmesser, die bei relativ geringen Flussraten betrieben werden (0,2 - 0,6 mL/min). Die Abgrenzung zur HPLC-Technik ist auf Grund der extrem hohen Druckverhältnisse von 1000 bis 1200 bar, wie sie in der UHPLC vor allem zwischen Pumpe und Trennsäule herrschen, vorzunehmen. Die Firma Knauer beispielsweise bietet seit einiger Zeit eine Anlage an die bis zu 700 bar leistet [78], und damit zwischen HPLC und UHPLC liegt. Durch Einsatz von modernen stationären Phasen (*Core-Shell* Partikel (s. Kapitel 4.1.2.4), aber auch durch Monolithen (s. Kapitel 4.1.2.2) [79]) lässt sich bei 600-700 bar die Trennleistung von UHPLC-Anlagen erreichen.

4.1.2 Material und Oberflächenchemie der Partikel

Heute übliche Säulen für routineanalytische Fragen sind partikuläre Säulenfüllungen aus vollporösen Kieselgelpartikeln mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 5 μm des Typs Rp18e. Rp steht dabei für *Reversed Phase* (Umkehrphase) und e für *endcapped* (s.u.). Umkehrphase deshalb, weil die hydrophilen Eigenschaften des Kieselgels durch eine chemische Modifizierung verloren gehen. Es liegt dann eine lipophile stationäre Phase vor. Ein solcher Partikel ist in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt. Einen Überblick zu weitere Materialien, wie Oxiden von Aluminium, Zirkonium oder Titan, sowie Styroldivinylbenzol-Harzen oder porösem Glas liefert Meyer in [66].

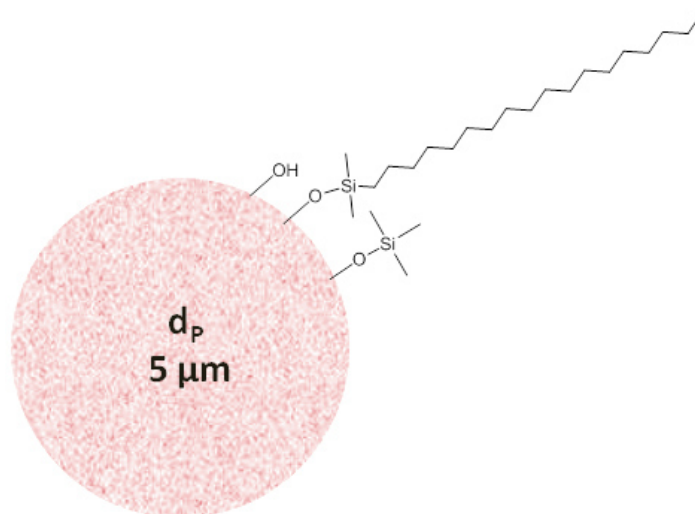


Abbildung 4.4 - Schematische Darstellung eines sphärischen Kieselgelpartikels nach Modifizierung mit Octadecylchlorosilan und anschließendem *Endcapping*. Einzelne Silanolfunktionen wurden nicht umgesetzt.

Der in Abbildung 4.4 dargestellte Partikel wurde an den an der Oberfläche befindlichen Silanolfunktionen chemisch modifiziert. Hierzu werden Chloralkylsilane verwendet. Die Umsetzung der Silanolfunktionen läuft dabei auf Grund der sterischen Hinderung durch bereits substituierte Silanolfunktionen nur unvollständig ab. Vor allem Silanolfunktionen im Inneren der Poren werden hierbei häufig nicht erreicht. Es werden daher nur etwa 50 % der oberflächlich gelegenen Silanolfunktionen erfasst (Rücker et al. 2001, S. 455). Um verbliebene oberflächlich gelegene Silanolfunktionen zu hydrophobisieren, werden anschließend kurzkettige Chloralkylsilane (meist Trimethylchlorsilan) verwendet. Diese sind auf Grund ihrer kompakten Struktur weniger der sterischen Hinderung ausgesetzt [66, S. 121–122]. Dieser als *Endcapping* bezeichnete Reaktionsschritt verläuft jedoch - wie fast jede chemische Reaktion - nicht vollständig. Je nach Wahl der Reaktionsbedingungen bei dieser Umsetzung variiert das Ergebnis der Modifizierung, weswegen RP18e-Phasen verschiedener Produktlinien und Hersteller sich zum Teil deutlich in ihrem Verhalten, Stoffe voneinander zu trennen, unterscheiden [80, S. 88–89]. Auch innerhalb einer Produktlinie ergeben sich Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen [81], welche besonders relevant ist für freigaberelevante Untersuchungen in der Arzneimittelherstellung. Ergeben sich abweichende Retentionszeiten oder relative Retentionszeiten in den Analysen, muss zunächst geklärt werden, was der Grund hierfür ist. Um solche Verzögerungen im Freigabeprozess zu vermeiden, werden HPLC-Säulen häufig in großen Vorratskäufen innerhalb derselben Charge beschafft oder Säulenchargen beim Hersteller reserviert.

4.1.2.1 Kieselgelbasiertes Säulenmaterial und der pH-Wert

Kieselgel ist formal ein Polymer der Kieselsäure $\text{Si}(\text{OH})_4$, welches sich in Kondensationsreaktionen pH-katalysiert bildet. Bei einem pH von > 2 erfolgt die Katalyse alkalisch, darunter azidisch [82, S. 923–924]. Der pK_S -Wert der Monokieselsäure wird nicht immer gleich angegeben. Die Werte reichen von $\text{pK}_{\text{S}1} = 9,51$ und $\text{pK}_{\text{S}2} = 11,74$ [82, S. 923] über $\text{pK}_{\text{S}1} = 9,8$ [83], zu $\text{pK}_{\text{S}1} = 9,5$ und $\text{pK}_{\text{S}2} = 12,6$ [84, S. 39]. Diese Unterschiede ergeben sich teilweise durch die Art der Bestimmung der pK_S -Werte.

Die Säurestärke ist im Verlauf der Polymerisation eine Funktion der Anzahl der bereits kondensierten Reste. Die Silanolfunktionen werden je nach Anzahl der bereits kondensierten Reste von Q^0 ($\text{Si}(\text{OH})_4$) nach Q^4 (Siloxanbrücke, $\text{Si}(\text{OR})_4$) benannt und weisen von Q^3 nach Q^0

geringer werdende Säurestärken auf [83]. Die in der Chromatographie relevanten Q^3 und Q^2 Silanolfunktionen weisen pK_s -Werte von 2-4,5 bzw. 8,5 auf. Etwa 81 % der Silanolfunktionen sind vom Typ Q^2 und 19 % Q^3 [83]. Die nach einer C18e-Modifizierung noch verbleibenden Silanolfunktionen weisen also weitestgehend geringe Säurestärken auf.

Die bei der Modifizierung verbleibenden Silanolfunktionen sind deshalb so erwähnenswert, weil sie die Peakform und darüber die Trennung von vor allem kationischen Strukturen, also in der Regel basischen Verbindungen, beeinflussen können. Dies äußert sich in einem zum Teil ausgeprägtem Tailing. Eine Erhöhung des pH-Werts im Eluenten würde diese Problematik zwar mindern, jedoch ist selbst modifiziertes Kieselgel noch hydrolyseanfällig bei extremen pH-Werten unter 2 und über 10. Viele RP-Phasen sind daher laut Hersteller für die Verwendung in einem pH-Bereich zwischen 2 und 7,5-8 zugelassen. Verschiedene Hersteller bieten aus diesem Grund zusätzlich pH-stabile stationäre Phasen auf Aluminiumbasis an, welche mit Polymeren wie Polybutadien beschichtet sind [85]. Im Jahre 2009 wurde ein Patent für eine kieselgelbasierte C18-Phase erteilt, welche bis pH 12 stabil ist [86, 87]. Dies wurde erreicht, indem Siliziumzentren durch Ethylenbrücken verknüpft werden, wodurch die Hydrolyselabilität bei hohem pH-Wert sinkt und laut Hersteller bzw. Patentinhaber auch die mechanische Stabilität der einzelnen Partikel steigt.

In der Größenausschlusschromatographie macht der Einsatz von Umkehrphasen wenig Sinn, da zwischen Analyt und stationärer Phase keine Wechselwirkung erzielt werden soll. Die Trennung erfolgt rein nach einem inversen Siebeffekt. Werden hierbei kieselgelbasierte stationäre Phasen verwendet, lässt sich daher aus den oben abgeleiteten Gründen eine weitgehend negativ geladene Oberfläche erzeugen, wenn man den pH-Wert nur hoch genug wählt. Diesen Oberflächeneffekt macht man sich für erweiterte Trennmechanismen, wie die modifizierte Größenausschlusschromatographie (mSEC), zu Nutze (s. Kapitel 4.1.4.3). Es ist jedoch Vorsicht geboten, da unmodifiziertes Kieselgel noch stärker hydrolyseanfällig ist. Hersteller beschränken die Anwendung auf einen pH-Bereich zwischen 2,5 und 7,5 [10].

4.1.2.2 Monolithische Umkehrphasen

Monolithische HPLC-Säulen wurden im Jahr 1991 erstmals in der Literatur beschrieben [88]. Hierfür wurden hochporöse, monolithische Kristalle aus hochreinem Kieselgel in einem Sol-Gel-Verfahren gezüchtet. Dies führte zur Ausbildung einer bimodalen Porenstruktur von ho-

her Porosität, bestehend aus großen Makroporen und kleineren Mesoporen. Die Porosität liegt mit ca. 80 % um etwa 15 % über der von partikulären Säulen [81]. In den Mesoporen finden die chromatographisch relevanten Wechselwirkungen statt, während die Makroporen auch bei hohen Fließgeschwindigkeiten für niedrigen Gegendruck sorgen [73]. Das Größenverhältnis von Makroporen zur Gerüstgröße liegt bei etwa 1 bis 2, während eine gut gepackte partikuläre Säule ein Verhältnis des Interstitialvolumens zur Partikelgröße von etwa 0,25 bis 0,4 aufweist. Dieses hohe Maß an Porosität im Monolithen senkt die Konvektion im Eluenten und führt somit zu einem erhöhten Massentransfer (C-Term) [73], was der Hauptgrund für die hohe erreichbare Trennleistung der monolithischen Säulen darstellt.

4.1.2.3 Effekt der Herstellung monolithischer Umkehrphasen auf die Trennleistung

Nakanishi et al. haben diese gezüchteten Monolithen dann in Schrumpfhülsen aus Polyetheretherketon (PEEK) verpackt [88]. Daneben gibt es das Verfahren die Kristallstäbe direkt in der Säulenhülse zu züchten [65, S. 455]. Problematisch bei diesem Verfahren ist das erhebliche Schrumpfen der Monolithen während der Reifung der Gerüststruktur. Vor allem lange Säulen mit hohem Durchmesser sind hier problematisch, was die Produktion auf eine Länge von 15 cm begrenzt [81]. Heute sind maximal 10 cm kommerziell erhältlich. Es sei darauf hingewiesen, dass durch die Eigenschaft der monolithischen Säulen auch bei hohen Flussraten nur geringe Gegendrücke zu erzeugen, es möglich ist, mehrere Säulen durch kurze Verbindungsstücke hintereinander zu schalten. Bei 5 hintereinandergeschalteten Säulen ergibt sich etwa eine Vervierfachung der Trennstufenzahl [89, S. 66]. Der Zusammenhang ist wohl aus dem Grund nicht linear, weil in den Kopplungsstücken zusätzliches Totvolumen entsteht und dadurch Bandenverbreiterung geschieht.

Aber auch bei kleineren Säulendimensionen erfährt die stationäre Phase eine gewisse Abnahme während der Ausbildung der Gerüststruktur. Daher wird der monolithische Stab während der in situ Herstellung chemisch kovalent an die Säulenhülle gebunden [90, S. 320]. Hierdurch ergibt sich dann jedoch eine, im Vergleich zum inneren Kern des Stabes, höhere Porosität während der Gerüstreifung, welche evtl. zu sogenannten Wandeffekten (engl.: *wall effects*) führt, wodurch die Eddy-Diffusion deutlich stärker ausfallen kann [91]. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase ist durch die Wandeffekte in der äußeren Schicht gegenüber dem Kern erhöht. Jedoch zeigten Untersuchungen, dass die Abnahme der Trenneffizi-

enz zwischen Säulenkern und den äußeren Schichten bei monolithischen Materialien etwa 25 %, bei partikulären Säulen zwischen 35 % und 50 % beträgt [90, S. 176]. Die Wandeffekte scheinen sich demnach nicht negativ auf die Trennleistung auszuwirken.

Bei der Herstellung außerhalb der Säulenhülse werden die monolithischen Stäbe in größeren Durchmessern gezüchtet und so die Volumenabnahme berücksichtigt. Die Herausforderung liegt dann darin, die Hülse so auf den Stab aufzubringen, dass keine Zwischenräume bleiben und ohne den Stab zu beschädigen. Zwischenräume würden ebenfalls zu Wandeffekten führen. Die Verwendung von PEEK als Hüllenmaterial hat sich hierzu bewährt und führt zu Ergebnissen, die quasi frei von Effizienzgefällen über den Säulendurchmesser sind [91]. Hierbei wird eine Schrumpfhülse aus PEEK um den Monolithen angebracht. Diese werden durch leichtes Erhitzen auf den monolithischen Stab angepasst. Die Modifizierung der Oberflächenstruktur erfolgt dann in der fertigen Säule [92].

Der zügige Massentransfer und der geringe Einfluss der Eddy-Diffusion führt zu einer Verbesserung der Trennstufenhöhe bei höheren Flussraten gegenüber partikulären Säulen, wie in Abbildung 4.5 dargestellt.

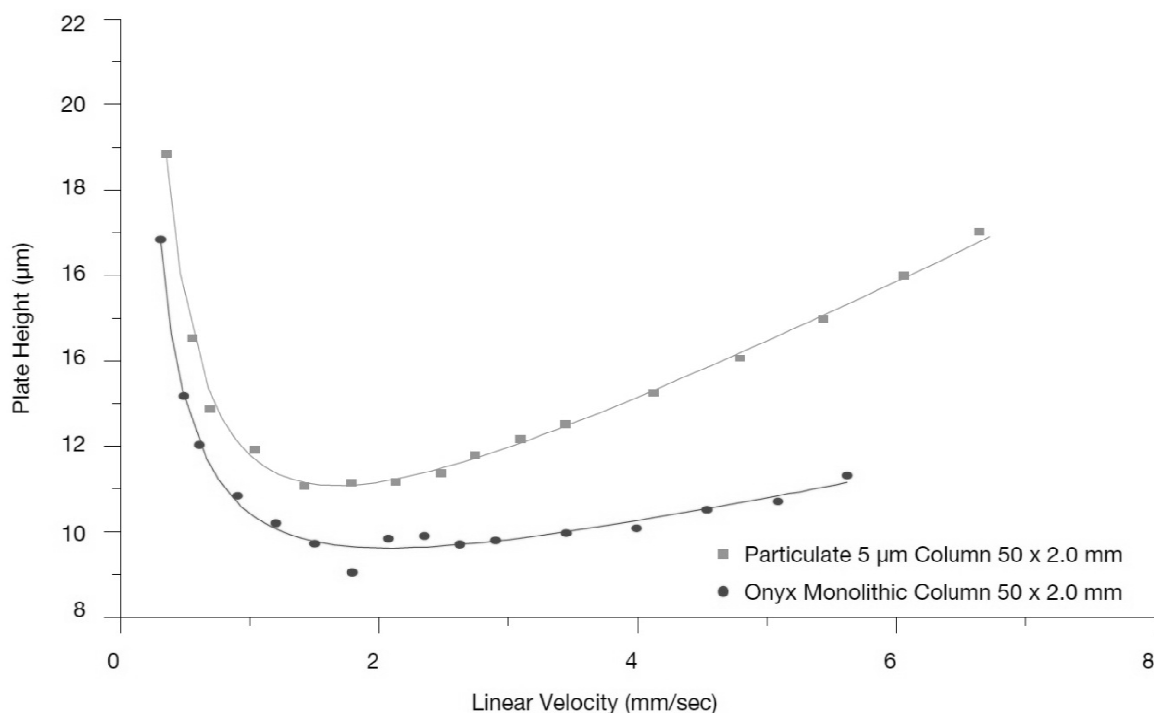


Abbildung 4.5 - Darstellung der Trennstufenhöhe (Plate Height) in Abhängigkeit der linearen Fließgeschwindigkeit (Linear Velocity), $H(u)$ für eine partikuläre Säule und eine monolithische Säule der Firma Phenomenex. Entnommen der Produktbroschüre zu "Phenomenex-Onyx" [93].

Ein Nachteil der hohen Porosität ist die geringe Beladungskapazität gegenüber vollporösen Partikeln [81]. Ein Grund hierfür ist die auf Grund der hohen Porosität geringere zur Verfügung stehende Oberfläche [90, S. 146]. Leinweber et al. zeigten jedoch vergleichbare Beladungskapazitäten für Monolithen und partikuläre Säulen. Sie begründeten dies damit, dass die geringe Menge an stationärer Phase durch die hohe Porosität kompensiert wird, da hierdurch ein höherer Anteil der stationären Phase zugänglich ist [94]. Es sei jedoch gesagt, dass in der Arbeit von Leinweber und Tallarek lediglich eine monolithische RP4-Umkehrphase auf dem Niveau der partikulären RP18-Umkehrphase lag und die Kapazität der Monolithen bei steigender Kettenlänge abnahm.

Tabelle 4.1 zeigt eine Übersicht zur Beladungskapazität von monolithischen und partikulären Säulen desselben Herstellers. Es fällt auf, dass die monolithischen Säulen bei geringeren Säulendimensionen vergleichbar hohe Beladungsmengen aufweisen.

Säulentyp		Säulendimension: Länge*Durchmesser [mm]	Beladungs- menge [mg]	Spezifische Oberfläche [m ² /g]	Injektionsvolumen [μl]	Quelle
partikulär 5 μm	analytisch	250 * 4	Ca. 5	350	5 bis 80	[89, S. 168, 95, S. 198]
	präparativ	250 * 25	Ca. 200	350	200 bis 3000	[95, S. 198]
monolithisch	analytisch	100 * 4,6	5	300	5 bis 50	[95, S. 214]
	präparativ	100 * 25	150 bis 370	350	100 bis 1500	[95, S. 254]

Tabelle 4.1 - Vergleich der Oberflächen und Beladungskapazitäten von gepackten partikulären 5μm und monolithischen Säulen mit jeweils einem analytischen und einem präparativen Vertreter desselben Herstellers. In Anbetracht der geringeren spezifischen Oberfläche und kleineren Säulendimension weisen die monolithischen Säulen höhere Beladungskapazitäten auf.

Eine Nachfrage beim Hersteller ergab, dass auch dieser der Meinung ist, monolithische Materialien hätten geringere Beladungskapazitäten als partikuläre stationäre Phasen. Wie auch die experimentell ermittelten Werten aus [94] und die Schlussfolgerung aus [90] steht dies im Kontrast zu den Daten aus den Produktdatenblättern der Säulen.

4.1.2.4 Core-Shell Partikel

Eine weitere bedeutsame Entwicklung der jüngeren Zeit ist die der *Core-Shell* Partikel (CSP). Es handelt sich um Partikel mit einem impermeablen, festen Kern, der mit einer dünnen Schicht der eigentlichen stationären Phase überzogen ist. Bereits im Jahre 1975 wurden *Porous Layer Beads* (PLB) in einem Lehrbuch zur HPLC beschrieben [96, S. 74]. Heutige Partikel sind jedoch anders dimensioniert als in den 70er und 80er Jahren. Die PLB wurden nach Engelhardt mit Partikelgrößen zwischen 40 und 90 μm angegeben, davon sind 1-3 μm eine poröse Schicht aus Kieselgel oder Aluminiumoxid bzw. Austauscherharzen auf dem undurchlässigen Kern aus Glas. Dies entspricht einem Anteil der porösen Schicht von etwa 2,5 % bis 3,3 %.

Heutige CSP sind von deutlich geringerem Durchmesser. Kommerziell verfügbare Säulenfüllungen sind mit Partikelgrößen zwischen 1,3 μm und 5 μm erhältlich, wobei für normale HPLC-Anwendungen bis 400 bar Partikel zwischen 5 μm und 3 (bzw. 2,6) μm , für UHPLC-Anwendungen Partikelgrößen kleiner 3,6 μm verwendet werden. Der Querschnitt der porösen Hülle macht bei allen Partikelgrößen zwischen 12,0 % und 13,8 % des Gesamtquerschnittes aus. Dies entspricht Schichtdicken zwischen 0,22 μm für 1,7 μm Partikel und 0,6 μm für 5 μm Partikel. Der feste Kern der CSP kann nicht vom Eluenten durchströmt werden. Die Diffusion eines gelösten Analyten ist daher nur in die poröse äußere Hülle möglich. Das gesamte verfügbare Volumen ist bei gleichen Säulendimensionen daher geringer und die Diffusion des Analyten während der Trennung wird unterdrückt. Hierdurch werden die Peaks schmäler und die Trenneffizienz der Säule erhöht sich. Dies lässt sich über den C-Term der van-Deemter-Gleichung darstellen (s. Formel 4.10).

Dieser setzt sich aus dem Massentransfer in der stationären Phase C_s und dem Massentransfer in der mobilen Phase C_m zusammen. C_m ist stark abhängig vom Partikeldurchmesser d_p und hängt des Weiteren vom Packungsgeometriefaktor w , welcher für eine homogene Packung des Säulenbettes klein wird, und dem Diffusionskoeffizienten in der mobilen Phase D_m ab [97, S. 41]. Bei der Herstellung von *Core Shell* Partikeln werden deutlich geringere Partikelgrößenverteilungen erreicht (RSD = 3-6 %) als bei vollporösen Partikeln (RSD = 10-30 %) [98], woraus eine einheitlichere Packungsgeometrie resultiert. Diese führt neben der Erniedrigung des C_m auch zu einem verkleinerten A-Term und somit zu einer Verringerung der Trennstufenhöhe. Hayes et al. [99] erklärten die Erniedrigung des A-Terms mit der rauerer

Oberfläche der CSP gegenüber vollporösen Partikeln. Die raue Oberfläche der Partikel sorgt dafür, dass die Partikel beim obligaten Verdichtungsschritt während der Säulenherstellung nicht aneinander vorbeigleiten und so eine homogene Packung des Säulenbettes beibehalten wird [99]. C_s wird bestimmt durch die Diffusion in den Poren der stationären Phase D_s und dem effektiven, also für den Analyten zugänglichen Partikeldurchmesser $d_{eff, p}$. Letzterer ist für CSP deutlich verringert. Da der C-Term linear mit der Flussrate verknüpft ist, weisen CSP-Säulen einen breiteren optimalen Bereich im van-Deemter-Plot auf als vollporöse Phasen und zeigen geringere Trennstufenhöhen als diese [7, S. 27] (s. Formel 4.11).

$$H = 2\lambda * d_p + \frac{B}{u} + (C_M + C_S) * u$$

Formel 4.10 - Van-Deemter-Gleichung mit ausgedehntem A und C-Term.

$$H = 2\lambda * d_p + \frac{B}{u} + \left(\frac{w * d_p^2}{D_M} + \frac{R_f * d_{eff, p}}{D_S} \right) * u$$

Formel 4.11 - Van-Deemter-Gleichung mit ausgedehntem A und C-Term. C_s und C_M sind hier weiter ausgedehnt. R_f ist ein Faktor, welcher vom Retentionsfaktor des Analyten abhängt [100, S. 632]. $d_{eff, p}$ ist der Grund für den erniedrigten Massentransfer und das breitere Optimum der Trennstufenhöhe im van-Deemter-Plot.

Auch der B-Term spielt eine entscheidende Rolle in der verbesserten Performance der CSP-Säulen. Die Verbesserung des B-Terms geht auf das gegenüber vollporösem Material stark erniedrigte Totvolumen der Säulen zurück. So liegt das Totvolumen etwa um 20-30 % unter dem von vollporösen stationären Phasen, wodurch es zu einer verminderten Longitudinaldiffusion kommt [99].

Wie bei den monolithischen Phasen bestehen auch bei den CSP widersprüchliche Aussagen zur Beladbarkeit der stationären Phasen. Hersteller sprechen über eine erhöhte Beladungskapazität. Da jedoch durch den impermeablen Kern deutlich weniger Oberfläche verfügbar ist, werfen solche Behauptungen zumindest Fragen auf. In [98] wird hierzu die erhöhte Partikeldichte angeführt. Bei einem Volumenanteil der porösen Phase von unter 14 % scheint diese Rechnung auf den ersten Blick nicht aufzugehen (s. Tabelle 4.2). Auch Hayes führt an, dass die bei den CSP erhöhte Partikeldichte nicht ausreichend ist um den Nachteil durch ein Weniger an aktiver Oberfläche pro Partikel auszugleichen [99]. K. Horvath et al. zeigten für präparative Säulen, dass die Beladbarkeit für die meisten Anwendungen für CSP deutlich geringer ist [101], auch Woodruff kommt bei einem einfachen Versuch auf einen

deutlich stärkeren Verlust der Trenneffizienz bei zunehmender Beladungsmenge gegenüber vollporösem Material [102].

	Porosität [%]	Oberfläche pro g stationärer Phase [m ²]
Monolithisch	ca. 80 [103]	250-300 [95]
Vollporös	ca. 65 [103]	350 [95]
CSP	ca. 40 [99]	170-210 [102]

Tabelle 4.2 - Übersicht zu der Porosität und der verfügbaren Oberfläche von monolithischen, vollporösen (partikulären) und CSP stationären Phasen. Die Werte sind als Größenordnung zu betrachten.

Da es bei der praktischen Anwendung in erster Linie auf die physikochemischen Eigenschaften des Analyten ankommt müsste für jede Anwendung das Ausmaß der Beeinflussung überprüft werden. Für viele Anwendungen ist auch weniger die absolute Beladungsmenge als vielmehr die an der stationären Phase adsorbierte Menge an Probe bedeutsam. Um adsorptionsbedingte Probenverluste zu vermeiden scheinen CSP ein interessanter Ansatz zu sein, den man aber je nach Art und Eigenschaft der Probe überprüfen muss.

4.1.3 Mobile Phasen für die Umkehrphasenchromatographie

In der Umkehrphasenchromatographie werden eher hydrophile Eluenten, die häufig aus Mischungen von organischen Lösemitteln mit Wasser oder wässrigen Pufferlösungen bestehen, verwendet. Der Eluent konkurriert mit dem injizierten Analyten um Wechselwirkungspunkte der hydrophoben stationären Phase. Je unpolarer der Eluent ist, desto stärker tritt er mit der stationären Phase in Wechselwirkung und desto weniger können die Analytmoleküle mit der stationären Phase wechselwirken. Da diese sich nun vermehrt im Eluenten aufhalten, werden diese schneller aus der Trennsäule heraus zum Detektor transportiert. Die Retentionszeit verkürzt sich bei der Verwendung von eher unpolaren (stärkeren) Eluenten daher. Die Polarität des Eluenten(gemisches) ist zusammen mit der Chemie der stationären Phase die zentrale Stellschraube um die Trennung zweier Analyten zu beeinflussen. Viele Arzneistoffe lassen sich auf einer RP18-Umkehrphase analysieren. Als problematisch gelten basische Arzneistoffe, da deren Kationen mit bei der Oberflächenmodifizierung nicht umgesetzten Silanolfunktionen, vor allem nach Deprotonierung zum Silanolat, elektrostatische Interaktionen ausbilden können, was zu einer schlechten Peaksymmetrie und somit auch häufig zu einer

verschlechterten Trennung führt. Neben dem bereits oben angesprochenem *Endcapping* muss über den pH-Wert des Eluenten möglichst verhindert werden, dass die Analyten als Kationen vorliegen. Auf Grund seiner zwei Pufferbereiche (pH 1,5-3,2 und pH 5,4-8,0) kann Phosphatpuffer universell eingesetzt werden. Als organische Komponente kommen neben kurzkettigen Alkoholen auch DMSO, Ethylacetat und Acetonitril in Frage. In dieser Arbeit kam eine Mischung aus Acetonitril und Phosphatpuffer zum Einsatz. Beim Arbeiten mit Mischungen aus Puffern und organischen Lösemitteln müssen vorher stets Löslichkeitstest vorgenommen werden. Lässt man die beiden Komponenten über den Mischer der HPLC-Anlage durchmischen, kann es zu Ausfällungen oder Phasentrennung kommen, welche zur Schädigung von Pumpe und Säule führen können. Es empfiehlt sich daher die beiden Komponenten vor der Analyse händisch zu mischen. Hierbei sollten möglichst große Volumen angesetzt werden, im Idealfall sollte das entstandene Volumen für die anstehende Untersuchung ausreichen. Dies hilft zufällige Fehler gering zu halten.

Häufiger wird die Frage diskutiert, ob das kostengünstigere Methanol ein adäquater Ersatz für Acetonitril darstellt. Die beiden Lösemittel unterscheiden sich in ihrer Elutionskraft und Lösungspotenz nur gering voneinander. Der höhere Preis des Acetonitrils rechtfertigt sich jedoch über die deutlich geringere Viskosität (0,37 mPa*s gegenüber 0,54 mPa*s von Methanol), was in der HPLC hohe Flussraten bei geringem Gegendruck ermöglicht. Vor allem aber ist die Giftigkeit von Methanol ein Grund für das teurere aber weniger bedenkliche Acetonitril. Diese Bedenken sollten vor allem dann gelten, wenn eine kontinuierliche Abluft für die Lösemittelabfälle nicht gewährleistet werden kann.

In welchem Verhältnis die Komponenten des Eluenten für eine isokratische Trennung angesetzt werden müssen, um eine gute Trennung der zu analysierenden Komponenten zu erhalten, kann über einen Gradientenlauf ermittelt werden. Das genaue Vorgehen hierzu kann aus der Literatur entnommen werden [9, S. 36]. Ist das ideale Eluentengemisch gefunden, sollte die Probe in diesem oder einem etwas schwächeren Eluenten gelöst werden, wodurch am Säuleneingang ein Zusammenschieben (Verkürzen) der Probenzone erreicht wird.

4.1.4 SEC

4.1.4.1 Anwendungsgebiete und Trennprinzip

Die Größenausschlusschromatographie (engl.: *Size Exclusion Chromatography*, kurz auch HP-SEC oder nur SEC) weist als Alleinstellungsmerkmal die Eigenschaft auf, dass der ablaufende Trennmechanismus ohne energetische Effekte abläuft [104, S. 207]. Die Trennung der Analyten funktioniert nach dem Prinzip eines inversen Siebes, wonach die Analyten in den Poren der Partikel der stationären Phase diffusionsgesteuert permeieren. Je größer diese Analyten sind, desto geringer ist das für sie verfügbare Porenvolumen. Analyten, die einen Radius aufweisen, der den Porenradius übersteigt (Ausschlussgrenze), werden vom Eluenten ungetrennt durch die Säule getragen und verlassen diese zuerst. Moleküle, welche einen so geringen Radius aufweisen, dass sie vollständig in die Poren der stationären Phase permeieren (Permeationsgrenze), verbleiben am längsten auf der Säule. Zwischen diesen beiden Extremen findet eine Auftrennung nach der Molekülgröße bzw. dem hydrodynamischen Radius (r_{hyd}) statt (s. Abbildung 4.6). Das Elutionsvolumen steht im Idealfall in einem logarithmischen Zusammenhang zur molaren Masse der Analyten [7, S. 90, 9, S. 214, 104, S. 211]. Mittels einer Kalibriergeraden kann die molare Masse bzw. der hydrodynamische Radius von Proteinen wie z.B. Insulin [105], rekombinantem Erythropoietin [106], monoklonalen Antikörpern [8] oder Polycystein [7, S. 95] ermittelt werden. Aber auch die Masse von Polyolefinen wie Polyethylen [107, S. 4] lässt sich mittels SEC bestimmen. Da die Trennung der Analyten rein durch Diffusion erfolgt, ist die Trennung nicht abhängig von der Flussrate des Eluenten, sondern vielmehr von dem eluierten Volumen. Daher wird bei der SEC der Elutions(zeit)punkt häufig auch in mL angegeben. Verwendet werden Flussraten zwischen 0,2 mL/min und 1 mL/min.

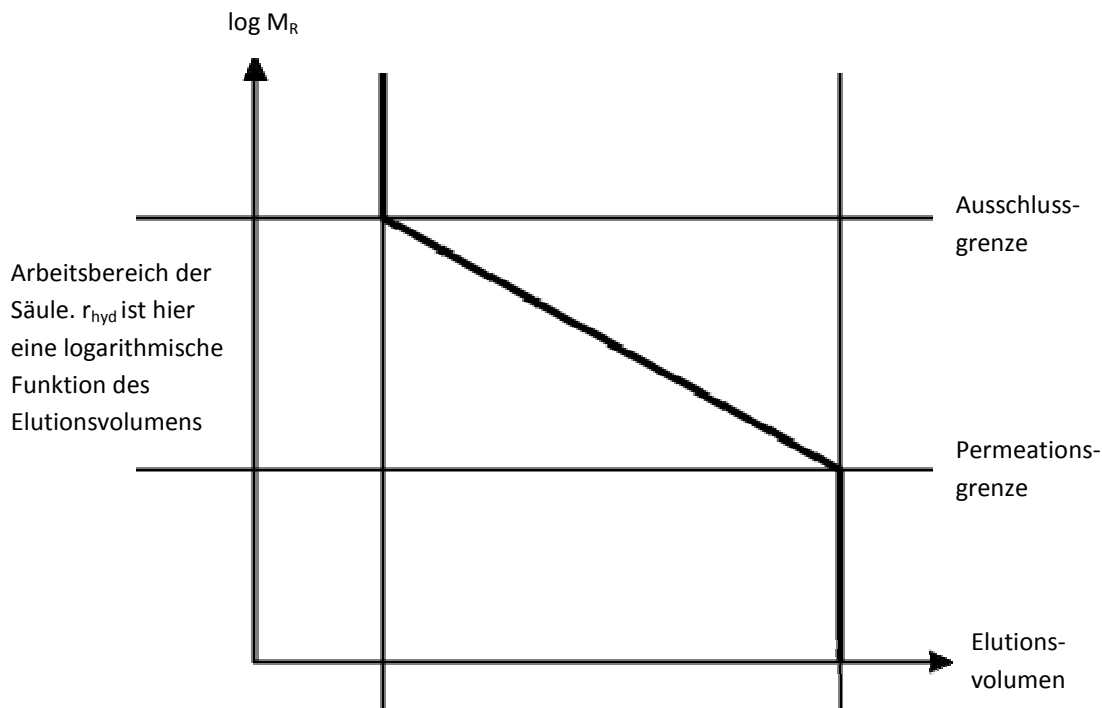


Abbildung 4.6 - Zusammenhang zwischen Elutionsvolumen und hydrodynamischem Radius bzw. Molmasse des Analyten. Nur innerhalb des Arbeitsbereiches, der zwischen Ausschluss- und Permeationsgrenze liegt, besteht ein Zusammenhang. Kleinere bzw. größere Moleküle eluieren zusammen und werden nicht getrennt. Weitere Informationen liefern [7] und [104]. Diese Arbeiten dienten als Vorlage für diese Grafik.

Es sei angemerkt, dass die Trennung im wässrigen Medium nach dem hydrodynamischen Radius erfolgt und dieser nicht direkt mit der molaren Masse eines Moleküls korrelieren muss. Daher kann mittels SEC strenggenommen keine exakte Massenbestimmung stattfinden. Es handelt sich bei der Massenbestimmung mittels SEC um eine, mit anderen Techniken wie der Massenspektrometrie verglichen, eher grobe Bestimmung der molaren Masse im kDa-Bereich. Um Aussagen über Aggregation oder Fragmentierung von Proteinen zu erhalten reicht die Massenauflösung aber vollkommen aus.

Die SEC ist außerdem kostengünstig, einfach, robust und schnell durchführbar, so dass sie für die genannten Anwendungen der Massenspektrometrie sogar vorzuziehen ist. Ein weiterer Vorteil der SEC gegenüber der Massenspektrometrie ist der weite Arbeitsbereich. Häufig sind Massendetektoren in einer LC-Kopplung für Massen bis 1000 Dalton ausgelegt. Die Proteine, die in dieser Arbeit verwendet wurden, weisen Massen zwischen 17 kDa und 660 kDa auf, was die Arbeit mit einem herkömmlichen Massendetektor unmöglich macht.

Die SEC kann grundsätzlich mit zwei Typen von Eluenten betrieben werden. Organischen und wässrigen. L. Kaminski nimmt daher in seiner Dissertationsschrift eine Abgrenzung zwischen der Gelpermeationschromatographie (GPC), welche mit organischen Lösemitteln als Eluent

betrieben wird, und der Gelfiltrationschromatographie (GFC), welche vorwiegend mit wässrigen Pufferlösungen betrieben wird, vor und fasst diese beiden Techniken unter dem Oberbegriff SEC zusammen [7, S. 89–90, 104, S. 8]. In der Tat werden diese drei Begriffe häufig synonym verwendet [9, S. 359] und selten scharf abgegrenzt. In dieser Arbeit wurde die Größenausschlusschromatographie zur Trennung von Proteinen unter Verwendung wässriger Pufferlösungen verwendet. Als Abkürzung hierfür soll fortan SEC verwendet werden.

Die Bestimmung von Proteinen kann in nativer oder denaturierter Form erfolgen. Die Denaturierung wird in der Regel durch Zusatz von Tensiden wie SDS erhalten. Durch den Zusatz von SDS kommt es zu einer Entfaltung des Proteins zu einer langen Aminosäurekette. Der Vorteil dieser Methode ist die gute Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proteine zueinander. Da die Konformation keine Rolle mehr spielt, kann hierdurch eine präzise Molekülmassenbestimmung durchgeführt werden. Die Länge der Kette verhält sich ungefähr linear zur Masse des Proteins.

Möchte man mit der nativen Proteinmolekülkonformation arbeiten, wird versucht möglichst schonend mit den zu analysierenden Proteinen umzugehen. Man verwendet dann Pufferlösungen mit leicht alkalisch bis neutralen pH-Werten im physiologischen Bereich. Die Proteine sollen dann in ihrer natürlichen Konformation vorliegen, in welcher diese eine bestimmte Faltung einnehmen. Die gefalteten Proteine werden von einer festen Hydrathülle umgeben, welche ihren Radius scheinbar erhöht. Man spricht dann vom hydrodynamischen Radius (r_{hyd}). Zur Größenbestimmung von nativen Proteinen bzw. Fragmenten und Aggregaten dieser, werden daher auch Proteine zur Kalibrierung verwendet (s. Abbildung 4.7).

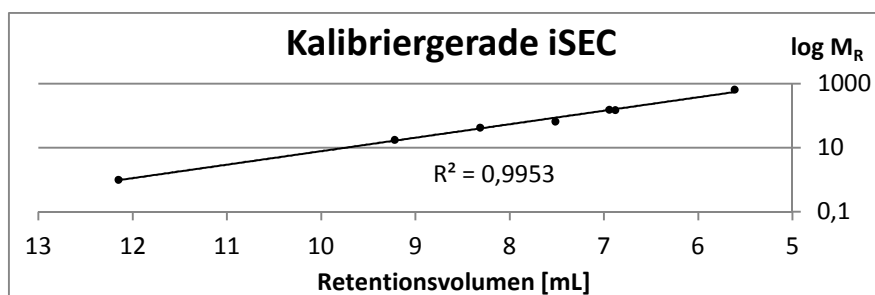


Abbildung 4.7 - Kalibriergerade für eine SEC-Säule, aufgenommen im idealen Modus (s.u.). Als Standards wurden verwendet: (in der Abbildung v.l.n.r.) Natriumazid (<1 kDa), Myoglobin (17 kDa), Ovalbumin (47 kDa), BSA (65 kDa), MAB (150 kDa), bovines γ -Globulin (150 kDa), Thyreoglobulin (660 kDa). Es ergibt sich ein logarithmischer Zusammenhang zwischen Elutionsvolumen und Molekülgröße bzw. hydrodynamischem Radius.

4.1.4.2 Die stationäre Phase - oder etwa nicht?

Auf Grund der geringen Wechselwirkungen, die zwischen Analytmolekülen und der stationären Phase in der SEC bestehen, wird im Kommentar zum Europäischen Arzneibuch die Größenausschlusschromatographie als eine Technik ohne eine stationäre Phase bezeichnet [108]. Die stationäre Phase darf hierbei jedoch nicht mit der Säulenpackung (=Säulenbett) gleichgesetzt werden. Die Säulenpackung kann aus unterschiedlichen Materialien gefertigt sein. Beispiele sind Styrol-Divinylbenzolcopolymere, Polyacrylate oder (modifizierte) Kieselgele. Für die Analyse von Proteinen werden in der Regel kieselgelbasierte Säulenpackungen verwendet. Diese weisen eine höhere Stabilität auf als organische Säulenpackungen [107, S. 4].

Die verwendeten Kieselgele werden chemisch modifiziert, um diese stabiler und inerte zu gestalten, jedoch machen die Hersteller keine genauen Angaben über die chemische Modifizierung. Eine telefonische Anfrage bei Merck KGaA ergab jedoch, dass auch bei Säulenpackungen neuerer Generationen, diese Modifizierung nicht erschöpfend durchgeführt werden kann, wodurch stets noch freie Silanolfunktionen vorliegen, welche einen erheblichen Einfluss auf die Trennergebnisse ausüben können (s. Kapitel 4.1.4.4). Um ein besonders hohes Maß an Inertheit zu schaffen um somit adsorptive Effekte gering zu halten, wird in den neuesten Säulenformaten mit besonders kleinen Partikeln aus hochreinem Silika gearbeitet. Dieses wird in Säulenmänteln aus mit „bioinertem“ Material ausgekleideten Stahlzylindern gebettet [109, 110]. Vermutlich handelt es sich bei dem bioinerten Material um das in der Chromatographie häufig eingesetzte PEEK. Ähnlich verfahren wird bei Leitungen aus PEEK im Ultrahochdruckbereich. Dort kommen mit Stahl oder Nickel ummantelte PEEK-Kapillaren zum Einsatz, um Adsorptionseffekte gering zu halten [111, 112].

Die Säulenpackungen bestehen wie in Kapitel 4.1.2.1 beschrieben auch bei SEC-Säulen aus sphärischen Kieselgelpartikeln. Für herkömmliche HPLC-Anwendungen kommen 5 µm und 3 µm große Partikel zum Einsatz. Partikelgrößen unter 3 µm für den UHPLC-Bereich stellen die neueste Anwendungsform dar. Die Folgen kleinerer Partikel mit homogener (enger) Größenverteilung wurden bereits weiter oben diskutiert. Für die SEC bedeutsam ist ein hohes Maß an Inertheit für eine möglichst geringe Probenadsorption, welche von vielen Anwendern gewünscht ist. Je mehr Oberfläche in der Säulenpackung zur Verfügung steht, desto mehr Wechselwirkungspotential ergibt sich jedoch an Silanolfunktionen, welche bei der Mo-

difizierung nicht umgesetzt worden sind. Die Oberflächenchemie der kleineren Partikel muss diesem Effekt daher überwiegen um an Inertheit zu gewinnen, da diese eine deutlich größere Oberfläche aufweisen. Da Silanolfunktionen auf Partikeloberflächen sauer reagieren, liegen diese bei physiologischen pH-Werten im Eluenten weitgehend als Anionen vor (s. Kapitel 4.1.2.1). Um die Effekte hierdurch möglichst gering zu halten, arbeitet man mit Eluenten hoher Ionenstärke [113]. Man kann die Ionenstärke jedoch auch bewusst gering wählen, um die Partikel der stationären Phase mit einer negativen Ladung zu versehen, welche genutzt werden kann um zusätzliche Trenneffekte zu erzielen. Die stationäre Phase wird spätestens bei dieser niedrigen Ionenstärke des Eluenten zu einer „konventionellen“ stationären Phase mit primärem Trenneffekt (inverses Sieb) und sekundärem Trenneffekt (elektrostatische Wechselwirkungen).

4.1.4.3 Mobile Phasen für die SEC

Die ideale oder konventionelle SEC

Wie bereits erwähnt, können sowohl wässrige Puffer als auch organische Lösemittel für die SEC verwendet werden. In dieser Arbeit werden organische Lösemittel lediglich zu Reinigungszwecken bei Spülprozessen eingesetzt. Wegen seiner ambiphilen Lösungseigenschaften und der geringen Viskosität eignet sich Acetonitril im besonderen Maße für diese Zwecke. Auf der Säule adsorbierte Proteine und Proteinfragmente werden durch das Lösemittel teilweise denaturiert und entfernt. Die Denaturierung geht auf eine Reaktion des Proteins auf die vergleichsweise hohe Lipophile des Acetonitrils zurück. Proteine verfügen über hydrophile und lipophile Bereiche. Unter physiologischen Bedingungen sind die lipophilen Bereiche in das Zentrum der Tertiärstruktur gerichtet und hydrophile Bereiche sind nach außen gerichtet und können so elektrostatische Wechselwirkungen mit der Umgebung eingehen. Ändert sich die Umgebung hinsichtlich ihrer physikalischen oder chemischen Eigenschaften, ändert sich auch diese Konformation des Proteins und dadurch auch die Art der Wechselwirkung. Acetonitril wird überwiegend hydrophobe Wechselwirkungen mit Proteinen ausbilden, während in wässriger Lösung elektrostatische Wechselwirkungen überwiegen.

Aber auch in wässrigen Medien spielen hydrophobe Wechselwirkungen eine gewisse Rolle. Vor allem bei hohen Ionenstärken des Eluenten treten diese in den Vordergrund, da durch den hohen Salzgehalt die Eigenladung von Proteinen aber auch andere Ladungen, wie die

von Silanolatgruppen, abgeschirmt und somit hydrophobisiert werden. Da diese Wechselwirkungen geringer ausfallen als etwaige elektrostatische Wechselwirkungen, lässt das Arzneibuch bei hohen Ionenstärken (ca. 0,1 mol/L bis 0,2 mol/L) arbeiten [114, 115].

Die modifizierte SEC

Kopaciewicz et al. bezeichnen diesen Vorgang der Ladungsüberdeckung als *Charge Shielding*. In ihrer Arbeit aus dem Jahre 1981 versuchten sie diesen Effekt gezielt zu unterdrücken, indem sie die Ionenstärke des Eluenten bewusst niedrig wählten [113]. Dies führte gewissermaßen zu einer Freilegung der Ladungen sowohl der Proteine als auch der stationären Phase, wodurch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Silanolatfunktionen in den Vordergrund treten.

Um eindeutig zu differenzieren, soll in dieser Dissertationsschrift das Arbeiten bei hohen Ionenstärken fortan als ideale SEC (iSEC) und das Arbeiten unter reduzierter Ionenstärke als modifizierte SEC (mSEC) bezeichnet werden.

Die Wahl des pH-Wertes nimmt bei Anwendung der mSEC eine besonders wichtige Rolle ein, wie nachfolgend dargestellt. Die Silanolfunktionen der stationären Phase sind bei den in der SEC verwendeten Puffern (i.d.R. PBS bei pH 6 - 8) weitestgehend deprotoniert (s. Kapitel 4.1.2.1), während die Nettoladung der Proteine bei diesen pH-Werten vom Betrag her positiv, negativ oder auch neutral vorliegen kann. Dies kann ausgenutzt werden um Trennergebnisse zu verbessern. Generell gilt, dass zwei Proteine mittels iSEC getrennt werden können, wenn sie sich in ihrer Masse um mindestens 10 % oder 20 % unterscheiden [104, S. 209, 116]. Sind zwei Proteine aufgrund des geringen Massenunterschieds unter normalen Bedingungen nicht trennbar, kann unter bestimmten Bedingungen eine Absenkung der Ionenstärke zur Trennungsverbesserung angewandt werden. Dies ist dann der Fall, wenn das kleinere (später eluierende) der Proteine bei pH 6 positiv geladen vorliegt. Es kommt dann zu einer verstärkten elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Protein und stationärer Phase, wodurch das Protein länger auf der Säule verbleibt. Voraussetzung hierfür ist, dass:

- 1) die Säulenpackung auf Kieselgel basiert und ausreichend deprotonierbare Silanolfunktionen zur Verfügung stehen

- 2) das größere Protein bei dem verwendeten pH vom Betrag her neutral oder besser negativ geladen ist
- 3) es durch die reduzierte Ionenstärke zu keiner relevanten Aggregation, Fragmentierung oder Denaturierung der Proteine kommt.

Eine Größenbestimmung aus unter diesen Bedingungen erhaltenen Chromatogrammen macht nur dann Sinn, wenn das Retentionsvolumen nicht beeinflusst wird und die Kalibrierung auf die gleiche Weise aufgenommen wurde. Die mSEC kann also gewinnbringend für bestimmte Trennprobleme eingesetzt werden. Sie ist aber auch dann sinnvoll, wenn verwendete Puffersalze kostspielig sind oder zu hohe Salzkonzentrationen Kopplungen mit orthogonalen Techniken stören würden (s. Kapitel 6.3.3.1).

Als Probenlösemittel sollte sowohl für die mSEC als auch für die iSEC jeweils der Eluent verwendet werden. Es sollte dabei versucht werden Probenlösungen möglichst geringer Viskosität herzustellen. Proteinlösungen weisen per se eine hohe Viskosität auf. Bei einer hohen Konzentration der Probe und einem großen Injektionsvolumen kommt es sonst zum sogenannten *viscous fingering* zwischen Probenlösung und Eluenten, was zu einem ausgeprägtem Tailing führt [117].

4.1.4.4 Vergleich zweier Säulen unter mSEC und iSEC-Bedingungen

Der Einfluss elektrostatischer Interaktionen ist in der iSEC ebenso unerwünscht wie eine dauerhafte Adsorption der Probenmoleküle auf dem Säulenmaterial. Auf Grund der erhöhten elektrostatischen Wechselwirkung in der mSEC besteht jedoch vor allem hier die Gefahr von ungewollter dauerhafter Adsorption der Probenmoleküle auf der stationären Phase. Hierunter kann auch die Reproduzierbarkeit einer Analyse leiden. So kann es bei den ersten Injektionen einer Messreihe zu Sättigungserscheinungen kommen, welche sich erst nach mehreren Injektionen stabilisieren. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt in den ersten Injektionen nach einer Reinigung der stationären Phase durch eine Spülprozedur mit tensidhaltigen Lösungen (s. Kapitel 9.2). Aber bereits nach einer Equilibrierung mit mobiler Phase kann man diese Erscheinung beobachten. In den Versuchen hierzu konnte eine Sättigung vermehrt im modifizierten Modus, aber auch in geringerem Ausmaß in der iSEC beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.8). Hierdurch wird die Präzision der Bestimmung beeinflusst. Bei den eingesetzten Konzentrationen ist die relative Zunahme an Signalintensität bei

drei Injektionen jedoch sehr gering, so dass trotzdem hohe Präzisionen erzielt wurden. Für geringere Injektionsmengen dürfte dieser Effekt jedoch bedeutsamer ausfallen. Neben der Reproduzierbarkeit, welche unter Adsorptions- bzw. Sättigungseffekten leidet, kann auf der Trennsäule anhaftendes Protein durch mikrobielle Kontamination zu einer Biofilmbildung führen, was die Säule irreparabel schädigen kann.

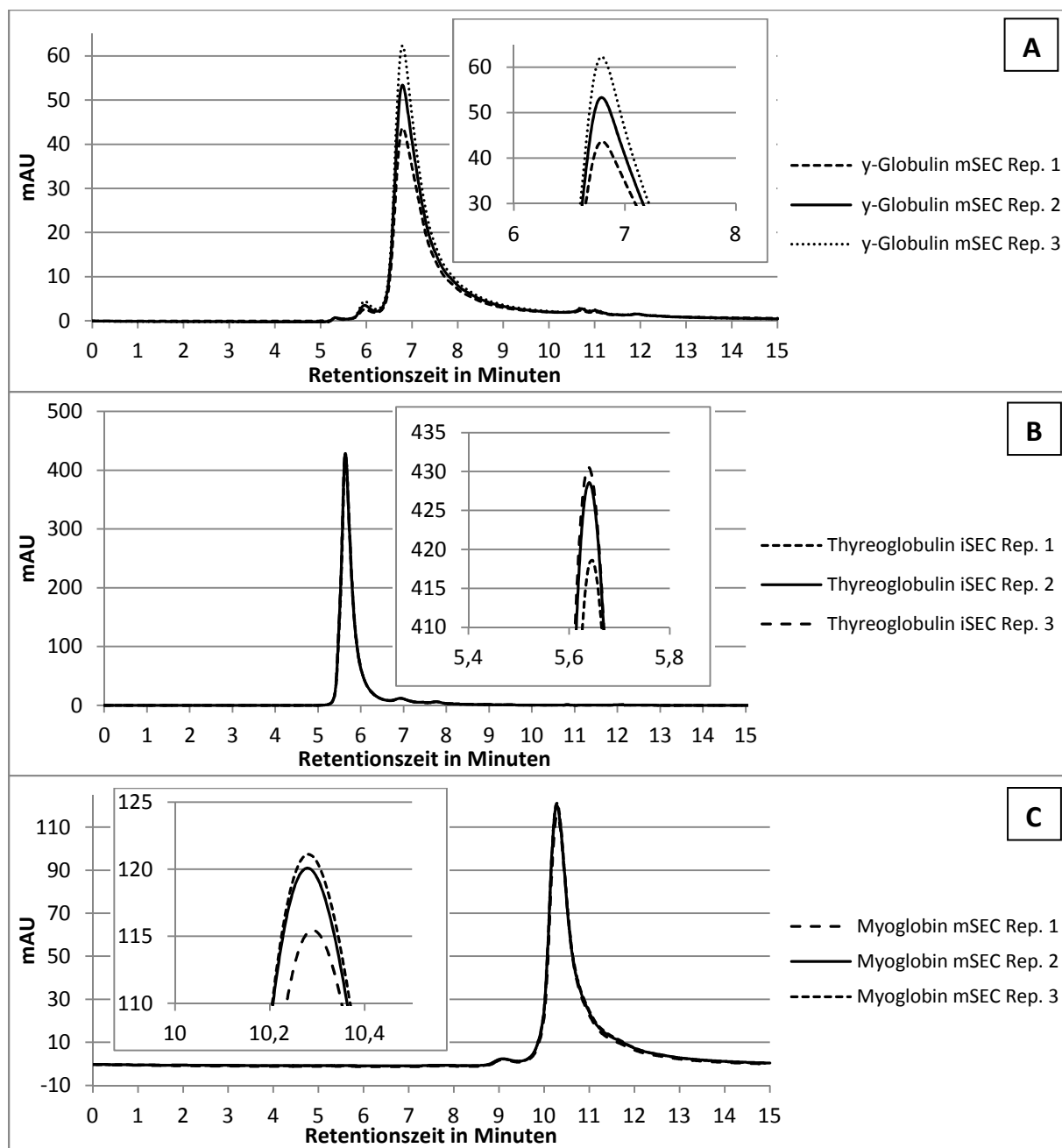


Abbildung 4.8 - Gezeigt sind Chromatogramme und Vergrößerungen dieser von aufeinanderfolgenden Injektionen derselben Probelösung nach Equilibrierung mit mobiler Phase. A zeigt die Zunahme an Signalintensität bei drei aufeinanderfolgenden Injektionen von bovinem γ -Globulin im mSEC-Modus. B zeigt diese Zunahme für drei aufeinanderfolgende Injektionen von Thyreoglobulin im idealen Modus. Für A und B wurde als Trennsäule eine Yarra® SEC-2000 der Firma Phenomenex verwendet. C zeigt die Zunahme an Signalintensität bei drei aufeinanderfolgenden Injektionen einer Myoglobinlösung im mSEC-Modus. Als Trennsäule wurde eine Biosep® S-3000 der Firma Phenomenex verwendet.

Die in der SEC verwendeten, wässrigen Eluenten bieten Mikroorganismen eine ideale Wachstumsumgebung. Um dies zu unterbinden, empfehlen die Hersteller die Säule bei kurzzeitiger Nichtverwendung bei einer Flussrate von 0,2 mL/min mit dem Eluenten zu spülen um ein Anhaften von Mikroorganismen zu verhindern und bei langfristigem Nichtgebrauch eine Säulenfüllung mit einer Natriumazidlösung (0,05 % m/V). Wie verderblich Proteinproben sind, zeigte auch die lichtmikroskopische Untersuchung einer Myoglobinlösung, welche nach Sterilfiltration für 2 Wochen bei Raumtemperatur geschlossen gelagert wurde (s. Abbildung 4.9). Der Grund für die Kontamination trotz Sterilfiltration könnte eine Übertragung von Pilzsporen über die Raumluft bzw. die darin enthaltenen Partikel sein. Ein Kubikmeter Luft in einem Reinraum der GMP-Kategorie A darf etwa 3500 Partikel enthalten. Ein Reinraum der Klasse C maximal 350000 Partikel pro Kubikmeter. Man darf davon ausgehen, dass die Partikelzahlen in normaler Laborluft nochmals deutlich höher ausfallen - diesen Wert wohl sogar um einige Größenordnungen übersteigen werden. Pilzsporen sind quasi ubiquitär zu finden. Außerhalb von geschlossenen Räumen findet man zwischen 1000 und 10000 Pilzsporen pro Kubikmeter [118]. Die Gefahr einer Kontamination ist daher auch unter besonders großer Vorsicht nicht auszuschließen, kann jedoch, wie in Kapitel 4.2 besprochen wird, deutlich reduziert werden.

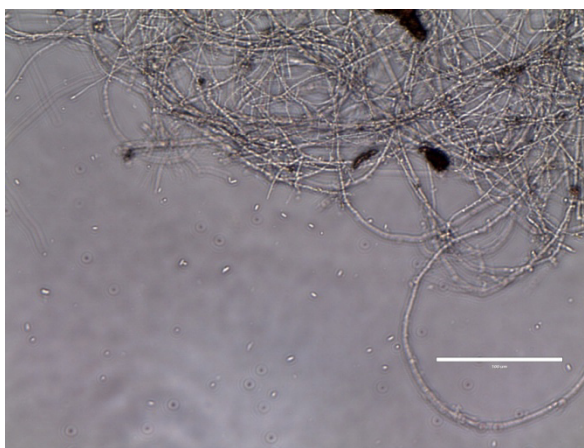


Abbildung 4.9 - Lichtmikroskopie einer myoglobinhaltigen Pufferlösung (PBS pH 6,5) nach fünfzehntägiger geschlossener Lagerung bei Raumtemperatur. Gut zu erkennen ist das Hyphengeflecht des Pilzmycels. Die schwarz erscheinenden Punkte sind ungelöste Myoglobinpartikel. Die Aufnahme erfolgte mittels Lichtmikroskop der Firma CarlZeiss unter Verwendung eines 10/0,22 Objektivs und CarlZeiss CPL W10x/18 Okularen. Der weiße Balken entspricht einer Strecke von 100 µm.

Um die Adsorption am Säulenmaterial zu prüfen, wurden die Peakflächen von Signalen der selben Probe, welche unter gleichen Bedingungen auf unterschiedlichen Trennsäulen erhal-

ten wurden, verglichen. Auch ein Vergleich zwischen dem idealen und dem modifizierten Modus ist so leicht möglich. Hierzu wurden die auch zur Säulenkalibrierung verwendeten Proteine jeweils dreimal pro Säule und Modus injiziert. Die Mittelwerte, der auf diese Weise erhaltenen Signalflächen, sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

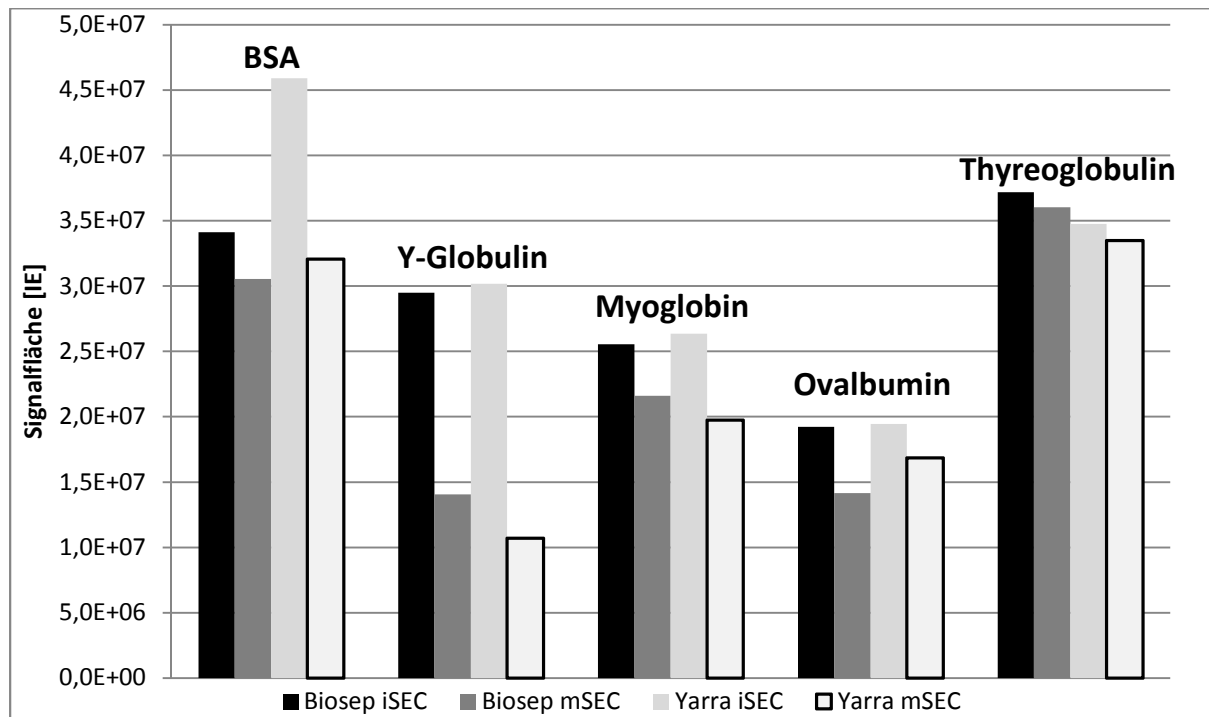


Abbildung 4.10 - Mittelwerte der Signalflächen von BSA, bovinem γ -Globulin, Myoglobin, Ovalbumin und Thyreoglobulin für zwei unterschiedliche Trennsäulen der Firma Phenomenex: Biosep® (5 μ m) und Yarra® (3 μ m), jeweils für den modifizierten und den idealen SEC-Modus. IE steht für die Signalfläche in Integrationseinheiten.

Säulen, die mit kleineren Partikeln gepackt sind, bieten eine größere Oberfläche an stationärer Phase bei sonst gleichen Säulendimensionen. So vergrößert sich die äußere Oberfläche der Partikel von 12,7 m² (5 μ m Partikel) auf 21,2 m² (3 μ m Partikel) [8]. Auch wegen der bei kleineren Partikeln höheren Packungsdichte ergibt sich bei gleicher Partikelporosität eine insgesamt größere Oberfläche und daher mehr potentielle Proteinbindung.

Im idealen Modus zeigt sich im Vergleich der beiden Trennsäulen nur für BSA ein Unterschied. Beide Säulen zeigen für den idealen Modus größere Flächenwerte als im modifizierten Modus, obwohl BSA, Ovalbumin und Thyreoglobulin bei dem Eluenten mit einem pH von 6,8 negativ und damit gleichgerichtet geladen sind wie die stationäre Phase. Die Adsorption geschieht im modifizierten Modus also unabhängig von der Ladung der Proteine. Besonders ausgeprägt scheint die Adsorption für den therapeutischen (nicht gezeigt) und den bovinen

Antikörper auszufallen (s. Abbildung 4.10). Für den therapeutischen Antikörper konnten im modifizierten Modus auf beiden Trennsäulen lediglich 1 % der Fläche vom idealen Modus gefunden werden, bei einer starken Verschiebung der Retentionszeit um etwa 4 Minuten auf (s. Abbildung 4.11). Aus vorhergegangenen Versuchsreihen war bekannt, dass dieser Antikörper zwar eine wesentliche Adsorption im idealen Modus zeigt, jedoch weitaus geringer ausgeprägt, als hier beobachtet. Außerdem kam es bislang nicht zu einer Verschiebung der Retentionszeiten.

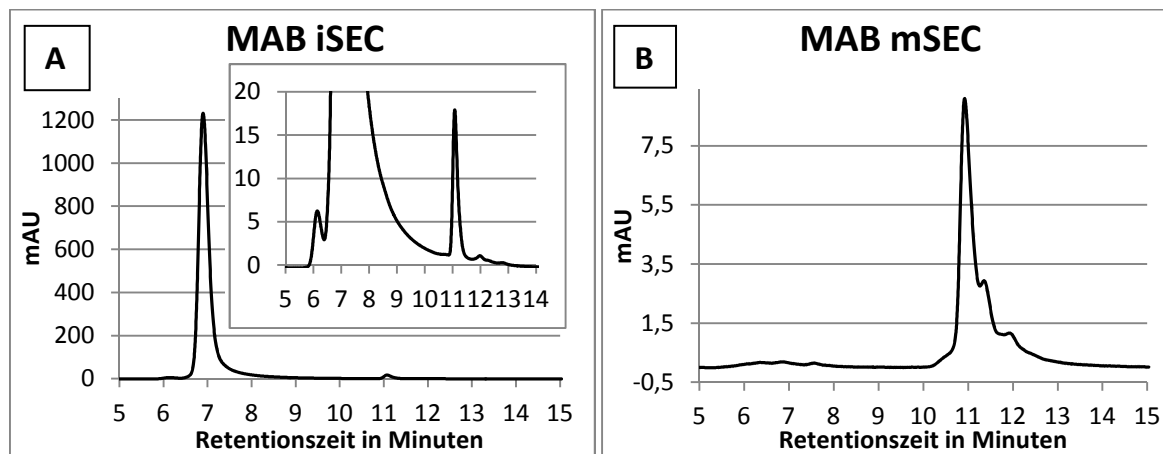


Abbildung 4.11 - Chromatogramme vom therapeutischen Antikörper im idealen Modus (A) und modifizierten Modus (B). Als Trennsäule wurde die Yarra® S-2000 von Phenomenex eingesetzt.

Um dieses Verhalten zu klären, wurden die Spektren und Chromatogramme der betreffenden Injektionen studiert. Bei Betrachtung der Chromatogramme war auffällig, dass im idealen Modus in der elften Minute Fragmente des Antikörpers eluiert werden [8]. Zur gleichen Zeit eluiert im modifizierten Modus das Monomer des Antikörpers (Abbildung 4.11 B). Über das DAD-Spektrum konnte nicht weiter unterschieden werden, ob es sich hierbei um Fragmente oder den ganzen Antikörper handelt. Da aber ein Fehlen von nur einer Fraktion eines Proteins weder durch Adsorption noch durch eine fehlerhafte Probenvorbereitung erklärt werden kann, muss es sich hierbei um einmalige Artefakte handeln. Der bovine Antikörper zeigt für beide Säulen eine deutliche Adsorption im modifizierten Modus (s. Abbildung 4.12).

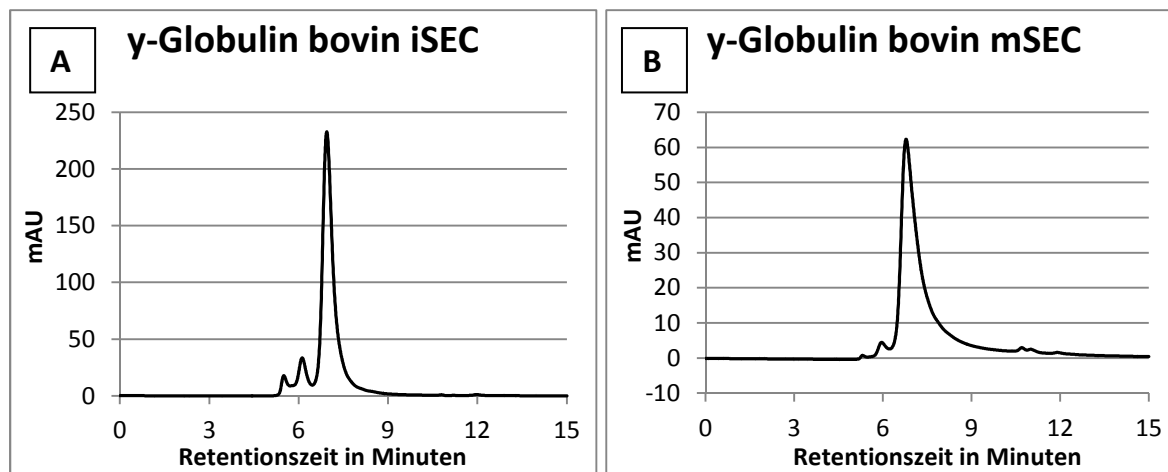


Abbildung 4.12 - Chromatogramme von bovinem γ -Globulin im idealen Modus (A) und im modifizierten Modus (B). Als Trennsäule wurde die Yarra® S-2000 von Phenomenex eingesetzt.

Vergleicht man die Abnahme an Signalintensität vom idealen zum modifizierten Modus von Biosep® und Yarra®, so zeigt sich für BSA, bovines γ -Globulin und Myoglobin eine stärkere Abnahme auf der Yarra®-Säule. Für Ovalbumin verhält es sich umgekehrt und für Thyreoglobulin werden für die Biosep® in beiden Modi höhere Intensitäten erhalten, jedoch ist der Unterschied der Modi für beide Säulen etwa gleichgroß. Leider lassen sich die Adsorptionsmuster, die hier festgestellt wurden, nicht mit den Proteineigenschaften (IEP, Größe, physiologische Funktion) in Deckung bringen. Jedoch lässt sich aus diesem Versuch ableiten, dass die größere Oberfläche der Yarra® trotz einer effizienteren Oberflächenmodifizierung, welche elektrostatische Interaktionen unterbinden soll, eine verstärkte Adsorption im modifizierten Modus zeigt, welche für drei von fünf getesteten Proteinen deutlicher ausgefallen ist als für das Säulenmaterial der Biosep®.

4.2 Probenvorbereitung - nicht immer unproblematisch

Die Probenvorbereitung steht stets vor der Analyse einer Probe durch den Analytiker. Sie ist ein obligater Teil des analytischen Arbeitens und kann einen großen Einfluss auf das Untersuchungsergebnis haben. Für jedes Arbeitsgebiet besteht eine gewisse Vorgehensroutine, wie z.B. die standardmäßige Ultraschallbehandlung von Probenlösungen um die Lösungsgeschwindigkeit zu erhöhen, oder das Einfrieren überschüssigen Probenmaterials (Aliquote) für den späteren Gebrauch. Häufig wird nicht vermutet, dass diese Schritte zur einer Beeinflussung der Proben oder zur Artefaktbildung bei der Analyse führen können. Es lohnt sich daher

die typischen Probenvorbereitungsschritte einmal genau zu betrachten und ihren Einfluss auf das Analysenergebnis zu hinterfragen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss auf Proteine durch das Frieren von proteinhaltigen Lösungen, die Verwendung von Ultraschallbädern und die Filtration durch verschiedene Filtermaterialien untersucht.

4.2.1 Frier-Tau-Zyklen

Liegen größere Volumina flüssiger Probe vor, ist aus vielerlei Gründen eine Lagerung dieser unter Kühlung anzuraten. Nach der van't Hoff'schen Regel wird, je tiefer die Temperatur ist, bei der die Probenlösungen gelagert werden, die Reaktionsgeschwindigkeit von Abbauprozessen umso geringer ausfallen. Bei den Abbauprozessen handelt es sich unter anderem um die Reduktion von Disulfidbrücken, Deamidierung, Oxidation oder Hydrolyse [119, 120], welche durch die Anwesenheit von katalytisch aktiven Substanzen noch beschleunigt werden können [121]. Eine Konsequenz daraus ist der (teilweise) Verlust der Konformation. Es kommt dabei zu einer Entfaltung der Tertiärstruktur und zur Bildung von Aggregaten [119]. Nicht alle Proteine zeigen hierbei eine gleichgroße Tendenz zur Aggregatbildung. Beerten et al. machten für die Aggregationsneigung bestimmte hydrophobe Regionen im Protein verantwortlich, die *aggregation prone regions* (APR). Diese befinden sich in der nativen Konformation nicht an der Oberfläche der Tertiärstruktur und treten erst durch äußere Stressfaktoren oder Proteinalterung nach außen, wo diese dann zu einer intermolekularen Wechselwirkung bzw. Aggregatbildung führen können [122].

Aber auch die bereits in Kapitel 4.1.4.4 angesprochene mikrobielle Kontamination ist als Ursache für konformationale Änderungen zu bedenken. Mikrobielles Wachstum ist bereits unter Kühlschrank-Bedingungen stark verlangsamt. Friert man eine Lösung ein, dann kommt das mikrobielle Wachstum und hierdurch bedingte enzymatische Reaktionen fast vollständig zum Erliegen. Zellproben, die lange Zeit konserviert werden sollen, werden in flüssigem Stickstoff bei etwa -196 °C schockgefroren. Neben der sehr geringen chemischen bzw. strukturellen Beeinflussung bei so niedrigen Temperaturen, hat das schnelle Einfrieren zum Vorteil, dass sich eine hohe Anzahl sehr kleiner Eiskristalle bildet. Große Kristalle, die durch langsames Einfrieren entstehen, schädigen Zellkompartimente oder die Zellwand und führen so zum Zelltod. Diese Überlegung ist jedoch nicht auf proteinhaltige Proben übertragbar. Die Vielzahl an Eiskristallen, die beim schnellen Einfrieren entsteht, bedeutet eine große Ober-

fläche, an der sich während des Einfrierens, die im wässrigen Milieu gelösten Probenbestandteile sammeln [33, 120, 123]. Durch den vermehrten Oberflächenkontakt kommt es zu einer verstärkten Aggregation der Proteine. Da es bei der Kristallisation der Lösung zunächst zu einer Erstarrung des Wassers kommt, wird dem Protein dieses entzogen. Hierdurch kann die Konformation des Proteins beeinflusst werden. APRs können bei einer weniger wasserhaltigen Umgebung an die Oberfläche des Proteins treten und so zu einer Aggregatbildung führen. Um diesem Problem entgegenzustehen, können Polyole, wie Trehalose oder Dextran als Kryoprotektoren verwendet werden. Diese ersetzen gewissermaßen das Wasser, da durch die Hydroxygruppen bis hin zum vollständigen Erstarren der Probe die Ausbildung von strukturgebenden Wasserstoffbrückenbindungen möglich ist [124]. Der Wasserentzug führt aber auch zu einer Aufkonzentrierung von Puffersalzen aus der Lösung. Hierdurch kommt es neben einer Veränderung des pH-Wertes zu einer Verschiebung der Ionenstärke in den flüssigen Regionen, wodurch wiederum ein Aussalzen der Proteine begünstigt wird [125].

Daher sollte für die Langzeitlagerung untersucht werden, welche Methode sich für das Einfrieren wässriger pufferhaltiger Proteinlösungen eignet. Hierzu wurden die Modellproteine Myoglobin, BSA, Ovalbumin sowie der therapeutische Antikörper mehreren Frier-Tau-Zyklen (FTZ) unterzogen. Hierzu wurden Lösungen der Proteine mit der Konzentration von 0,1 % (m/V) in iSEC PBS pH 6,8 gelöst. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 0,2 % (m/V) im selben Puffer hergestellt. Jeweils 500 µL jeder dieser Lösungen wurden zunächst in dreimal sechzehn Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL) pipettiert. Die Frierzyklen wurden bei -5 °C im Eisfach eines Laborkühlschranks und bei -196 °C in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Jeweils fünfzehn Aliquote eines Proteins wurden zusammen eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut.

In einer separaten Versuchsreihe wurden drei verschiedene Temperaturen zum Auftauen der Lösungen nach Einfrieren von Aliquoten untersucht. Es machte dabei für die getesteten Proteine keinen Unterschied ob im Kühlschrank (8 °C), bei Raumtemperatur (20 °C), oder Handwarm (simuliert im Säulenofen bei 34 °C) aufgetaut wurde (Daten nicht gezeigt).

Ein Aliquot wurde zur Analyse in der HPLC nach der Methode aus Kapitel 8.1.4.1.2 beiseite gestellt und die übrigen Aliquote wieder eingefroren. Dies wurde wiederholt bis für jedes Protein und beide Temperaturen eine Zyklenzahl von 0-15 vorlag. Nach der Literatur sollten die in Stickstoff gefrorenen Proben am stärksten beeinflusst werden.

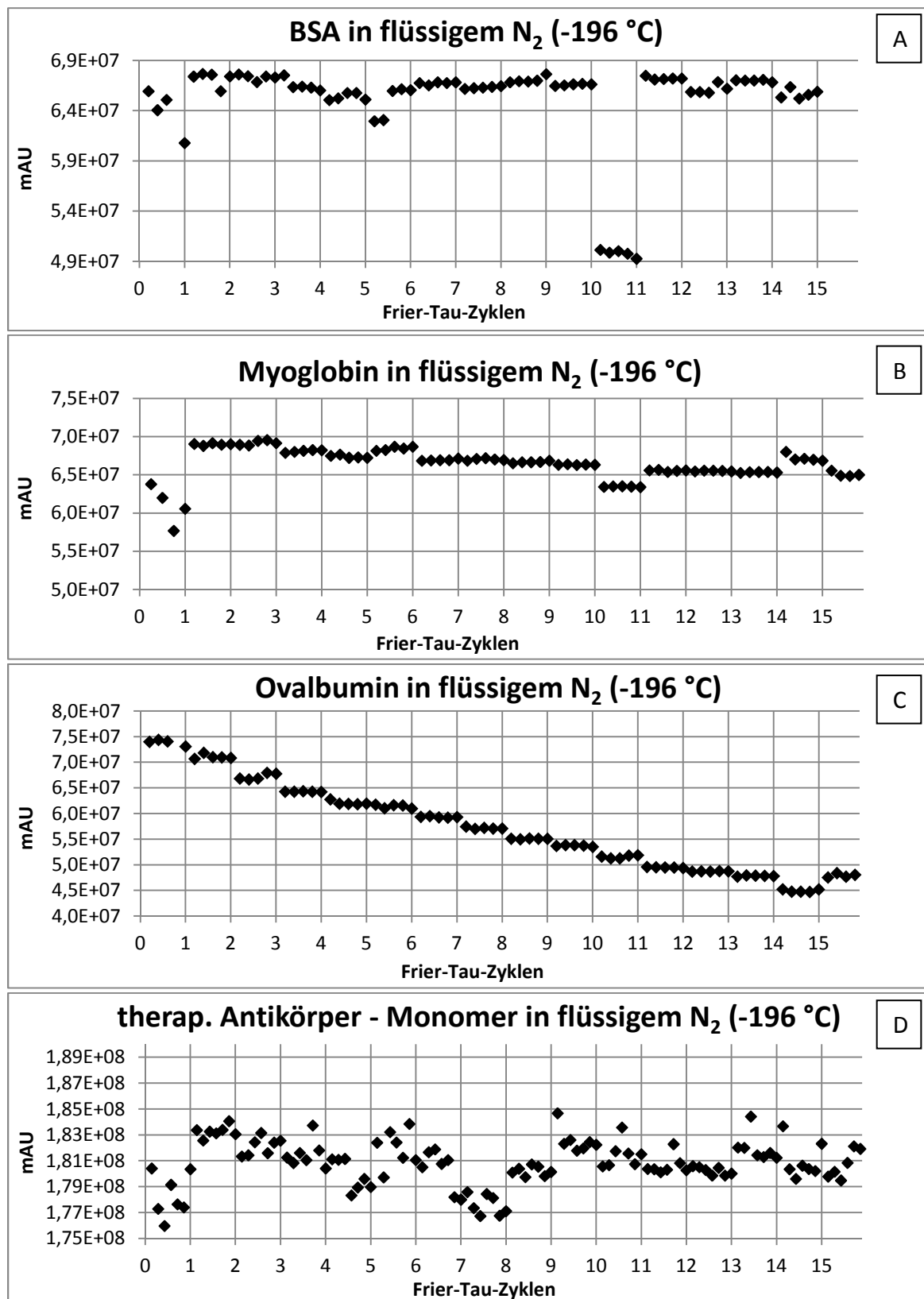


Abbildung 4.13 A bis D - Gezeigt sind die Signalfächen der Modellproteine nach mehrmaligem Frieren in flüssigem Stickstoff. Es sind alle Flächen aller Injektion dargestellt. Die vertikalen Linien zeigen die durchlaufene Zyklenzahl der Proben an. Es erfolgten pro Zyklus pro Protein fünf (therp. Antikörper: sieben) Injektionen. Die letzten Datenpunkte für Zyklus 15 von BSA fehlen. Das Reaktionsgefäß ging während des Versuches zu Bruch. Die nicht gefrorenen Bezugslösungen von Myoglobin, BSA und Ovalbumin wurden jeweils viermal injiziert.

Abbildung 4.13 zeigt den Einfluss des wiederholten Einfrierens und Auftauens auf in Puffer gelöste Proteine mittels flüssigem Stickstoff. Eindrucksvoll ist die Abnahme an registrierter Signalfläche bei Ovalbumin (C) zu sehen. Nach 15 Zyklen erreichen etwa 35 % des ursprünglich vorhandenen Proteins nicht mehr den Detektor. In den entsprechenden Chromatogrammen hierzu tauchen keinerlei zusätzliche Signale auf, so dass man davon ausgehen kann, dass größere Aggregate gebildet werden, die durch den Vorsäulenfilter abgesondert werden und so gar nicht erst auf die Trennsäule gelangen. Der Einfluss auf Myoglobin (B) fällt weniger deutlich, aber dennoch eindeutig aus. Auch hier werden keine zusätzlichen Signale registriert, was wahrscheinlich ebenfalls auf der Absonderung von Aggregaten beruht. Hier sieht man zwei Gruppen, die vom Trend abweichen bei 9 bzw. 13 Zyklen. Diese können auch bei BSA (A) nach 10 Zyklen oder bei Ovalbumin (C) nach 14 Zyklen beobachtet werden. Der Grund hierfür ist, dass die Proben sich zwar gleichen, jedoch nicht die selben sind. Die Schädigung der Proteinstrukturen ist Schwankungen unterworfen. Diese beruhen auf den oben bereits erwähnten Abläufen in den Aliquoten während des Frierens. Die Oberflächenzunahme durch Kristllwachstum fällt bei raschem Einfrieren zwar stärker aus als bei langsamen Frieren, jedoch ist das genaue Ausmaß dem Zufall unterworfen. Auch die Verschiebung des pH-Wertes und die Erhöhung der Salzkonzentration durch Wasserentzug können bei dem Einfriervorgang variieren. Eine große Stichprobenzahl ist hier daher besonders sinnvoll.

Die erwartete starke Beeinflussung des therapeutischen Antikörpers blieb aus (D). Anders als bei den anderen Proteinen, waren für den therapeutischen Antikörper jedoch zusätzliche Signale im Vergleich zur unbehandelten Ausgangslösung zu erkennen, die sich erst durch ein eingängiges Betrachten der Chromatogramme erkennen ließen. Die Signalfläche, die sie einnehmen, ist zu gering um die Fläche des monomeren Antikörpers statistisch auffällig zu senken. Der Anteil an Dimeren lag nach 15 Zyklen bei 1,59 % (0,91 % in der unbehandelten Ausgangslösung), der der Multimeren bei 0,16 % (0 % in der unbehandelten Probe). Anhand einer Größenkalibrierung wurde bestimmt welche ungefähre Masse diese Signale besitzen. Es handelt sich demnach um ein Dimer des Antikörpers (Abbildung 4.14 A) bzw. um ein Multimer (Abbildung 4.14 B), letzteres lag jedoch oberhalb des obersten Kalibrierstandards (Thyreoglobulin).

Dieses Verhalten des Antikörpers ist jedoch trotz des geringen Ausmaßes als besonders kritisch zu bewerten, da bei der intravenösen Applikation diese Bestandteile ein erhöhtes Immunisierungsrisiko bedeuten (s. Kapitel 2.3), auch weil das Einfrieren bzw. die Gefriertrocknung bislang ein fester Schritt in der Herstellung therapeutischer Antikörper ist. Durch die Lyophilisierung kann eine lange Haltbarkeit von Proteinen erreicht werden. Diese müssen jedoch eine ausreichend hohe Stabilität gegenüber den Stressfaktoren während des Frierens aufweisen. In der im Mai 2016 erschienenen Monographie "*Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies*" wird ein Grenzwert für den Anteil an Aggregate bzw. *high molecular weight species* von 0,67 % angegeben [5, 6]. Dieser Grenzwert wird hier deutlich überschritten. Gründe vor das Vorliegen eines Dimeranteils von 0,91 % bereits vor dem ersten Zyklus mögen auch Ursache des Verwerfens der Studie gewesen sein (s. Kapitel 2.2). Weitere Ursachen sind im Transport und der erstmaligen Einlagerung der Proben zu vermuten.

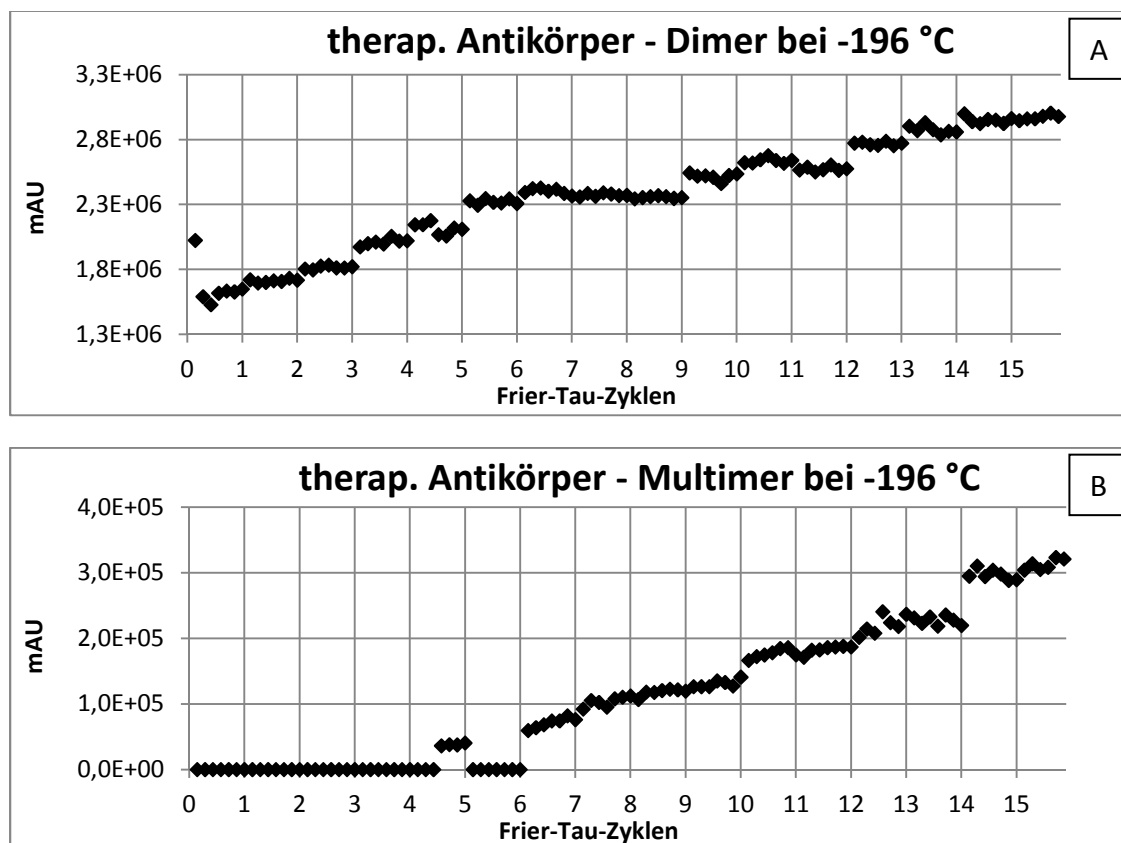


Abbildung 4.14 A und B - Signalfächen von durch angewandte Frier-Tau-Zyklen, entstandene Aggregate. A zeigt die Signalfäche des dimeren Antikörpers (ca. 300 kDa), B zeigt die Signalfäche von einem Multimer mit der ungefähren Masse von 700 kDa. Man beachte die geringe absolute Signalintensität, die etwa um den Faktor 100 für das Dimer bzw. Faktor 1000 für das Multimer unter den Intensitäten für das Monomer liegen.

Die Ergebnisse für die Zyklen bei -5 °C, bleiben erwartungsgemäß unauffällig (s. Abbildung 4.15). Die bei Zyklus 10 für Ovalbumin bzw. Zyklus 11 für BSA auftauchenden Abweichungen stellen gerätebedingte Fehler dar. Dies ist daran zu erkennen, dass von den fünf Injektionen jeweils zwei im Trend liegen. Bei Sequenzen dieser Länge kann es zu einer Auskeimung von Gasblasen an den Lösemittel-Einlassfritten kommen. Wird eine Gasblase in das Eluentensystem eingeschleust, kann diese sich an den Kolben der Fließmittelpumpe anlagern und auf diese Weise Druckschwankungen verursachen. Dies führt über einen verminderten Gesamtvolumenstrom zu einer Verschiebung der Retentionszeiten, Peakdeformation und Integrationsfehlern. Für den therapeutischen Antikörper wurden 10 statt 15 Zyklen durchgeführt.

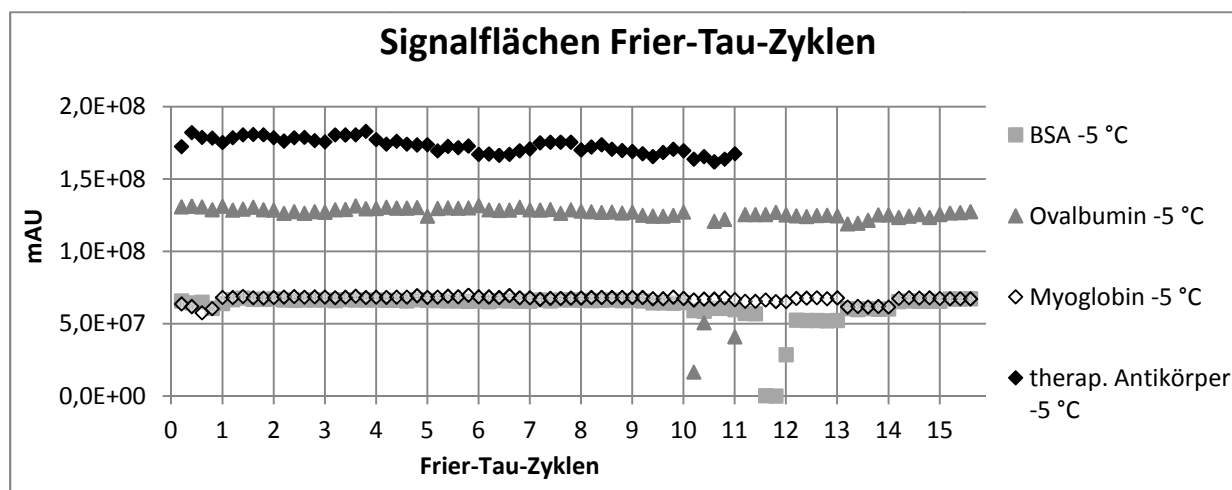


Abbildung 4.15 - Gezeigt sind die Signalflächen der Modellproteine nach mehrmaligem Einfrieren bei -5 °C. Es sind alle Flächen aller Injektion dargestellt. Die vertikalen Linien zeigen die durchlaufene Zyklenzahl der Proben an. Es erfolgten pro Zyklus und pro Protein 5 Injektionen.

Für den therapeutischen Antikörper ist in dieser Darstellung eine geringe Tendenz abnehmender Signalfläche zu erkennen. In der Tat beträgt die Differenz etwa -8,6 % im Vergleich zur unbehandelten Probelösung. Die Behandlung in Stickstoff zeigt diese Tendenz nicht. Jedoch zeigt ein Studium der Chromatogramme der Frier-Tau-Zyklen bei -5 °C des Antikörpers im Vergleich zur Referenzlösung keinen erhöhten Aggregatanteil und nur eine geringe Steigerung (+5 %) an Bestandteilen mit geringem hydrodynamischem Durchmesser (Fragmente von ca. 3 - 8 kDa) gegenüber der Referenz. Die Beeinflussung der Proteinstruktur durch Einfrieren ist dem Zufall unterworfen, jedoch zeigt schnelles Einfrieren für die meisten Modellproteine einen stärkeren Effekt, weshalb das außerdem einfach durchzuführende Einfrieren im Gefrierfach hier zu bevorzugen ist. Zudem birgt Stickstoff Probleme in der Handhabung

bzw. ein gewisses Gefahrenpotential. So muss in gut belüfteten Räumlichkeiten, stets unter Anwesenheit einer zweiten Person mit erweiterter Schutzausrüstung gegen Kälte gearbeitet werden.

4.2.2 Ultraschall

Ultraschall in einem Ultraschallbad wird üblicherweise verwendet um Laborgeräte und optische Bauteile aus lichtdurchlässigen Materialien zu reinigen. Letztere werden bevorzugt auf diese Weise gereinigt, da die Gefahr der Oberflächenbeschädigung (Kratzer) gegenüber der mechanischen Reinigung ungleich geringer ist. Verwendet man ein mit einem organischen Lösemittel gefülltes Becherglas in ein Ultraschallbad, können darin auch stark lipophile Verunreinigungen effektiv gelöst werden. Auf diese Weise können beispielsweise Acetonitrilpolymerisate an den Saphirkugeldichtungen von HPLC-Pumpen effektiv entfernt werden.

Die Funktion dieser Reinigung beruht auf dem Prinzip der Kavitation. Ein Impulsgeber erzeugt sinusförmige Druckwellen in der Füllflüssigkeit des Ultraschallbades. Hierzu wird i.d.R. Wasser verwendet. Es entstehen Zonen mit Überdruck denen Unterdruckzonen folgen. Generell ergeben sich zwei mögliche Folgen hieraus, die stabile Kavitation (Gaskavitation) und die transiente Kavitation (Dampfkavitation) [126, S. 7]. In beiden Fällen entstehen durch den Unterdruck wasserdampfgefüllte Räume (Kavitäten) in der Flüssigkeit, welche durch die nachfolgende Druckwelle wieder komprimiert werden. Transiente Kavitäten haben eine kurze Lebensdauer von nur wenigen Hoch-Unterdruckzyklen, in denen sie sich mit Wasserdampf füllen, bevor sie in einer Hochdruckzone implodieren.

Bei der Implosion von Kavitationsblasen kommt es zu einer schlagartigen Füllung der Kavität mit dem umgebenden Wasser. Es gibt unterschiedliche Theorien, die diesen Vorgang zu charakterisieren versuchen. Eine weitverbreitete Theorie besagt, dass es (rechnerisch) zu Temperaturen von 2000 K bis 5000 K und Drücken bis zu 3000 bar kommt [126, S. 12]. Ashokkumar verwendete Formel 4.12 um die entstehende Temperatur in Wasser zu berechnen und kam dabei auf 6150 K [127].

$$T_{max} = T_0 \frac{P_m(\gamma - 1)}{P_v}$$

Formel 4.12 - Formel zur Abschätzung der bei dem Kavitationskollaps entstehenden maximalen Temperatur T_{max} nach [127]. Mit T_0 für die Wassertemperatur, P_m für den Druck in der Flüssigkeit (Summe aus hydrostatischem und akustischem Druck), P_v für den Druck in der Kavität bei maximaler Ausdehnung und γ für den Adiabatenexponenten des Gas-Dampf Gemisches innerhalb der Kavität.

Die Größe der entstehenden Kavitäten ist hierbei abhängig von der Schallintensität und der Frequenz des Schalls. Je höher die Frequenz ist, desto kürzer sind die Zeiträume der Expansion und der Kompression der Kavität. Je mehr Zeit die Kavität hat um sich mit Gasen und Wasserdampf zu füllen, desto stärker wächst sie an und desto stärker fällt der Kollaps aus, was nach Formel 4.13 zu einer höheren Temperatur führt.

$$T_{max} = T_0 \left(\frac{V_0}{V_{max}} \right)^{\gamma-1}$$

Formel 4.13 - Formel zur Abschätzung der bei der Kavitationskollaps entstehenden maximalen Temperatur T_{max} nach [126]. Mit T_0 für die Wassertemperatur, V_0 für das minimale Kavitätenvolumen, V_{max} für das maximale Kavitätenvolumen und γ für den Adiabatenexponenten des Gas-Dampf Gemisches innerhalb der Kavität.

Hierbei wird davon ausgegangen, dass der Kollaps adiabatisch verläuft. Dies kann strenggenommen nur für Frequenzen über 300 kHz angenommen werden. Übliche Laborultraschallgeräte arbeiten bei Frequenzen von 35 kHz - 50 kHz. Unterhalb von 300 kHz spielt die Wärmeleitfähigkeit des Gas-Dampf Gemisches eine zunehmend größere Rolle. Je höher diese ist, desto mehr Wärme kann an das umgebende Medium abgeführt werden, wodurch der Temperaturanstieg gesenkt wird [126, S. 13]. Auch wenn die Temperatur ein Maximum bei einer Frequenz von 300 kHz erreicht, wird die ideale Frequenz für sonochemische Reaktionen zwischen 20 kHz und 40 kHz bei 250 - 300 Watt angegeben [128, 129].

Die Bedingungen, die durch den Kollaps der Kavitäten geschaffen werden, können genutzt werden um den Ablauf chemischer Synthesen zu verbessern [128], führen aber auch zur Bildung von Hydroxyl- bzw. Wasserstoffradikalen und anderen hochreaktiven Verbindungen [130], welche zu unerwünschten Nebenreaktionen führen könnten. Gülseren et al. stellte fest, dass die Funktionalität von BSA durch Ultraschall beeinflusst wird. Nach 90 Minuten im Ultraschallbad stieg die Partikelgröße in einer BSA-Lösung an und die Zahl der freien Thiofunktionen sank gleichzeitig. Sie vermuteten daher die Bildung von Aggregaten durch die Ultraschalleinwirkung [130]. Bereits 1963 kamen Hess et al. zu vergleichbaren Resultaten

[123]. Gülseren et al. geben in ihrer Arbeit nicht an, mit welcher Frequenz das von ihnen verwendete Ultraschallgerät betrieben wurde, Hess et al. verwendeten ein 9 kHz Generator mit 50 Watt.

Proteinlösungen werden zur Beschleunigung der Lösung häufig im Ultraschallbad behandelt. Hierbei wird derselbe Effekt der Kavitation verwendet, der auch zum Reinigen von Gegenständen benutzt wird. An der Phasengrenze fest/flüssig bilden sich bevorzugt Kavitäten. Wenn diese implodieren bildet sich ein auf die feste Phase gerichteter Flüssigkeitsstrahl, welcher Geschwindigkeiten bis 150 m/s erreicht [131, S. 34–35]. Durch diese mechanische Einwirkung erfolgt eine Zerkleinerung von Proteinpartikeln und in der Folge eine beschleunigte Lösung.

4.2.2.1 Untersuchung der Unbedenklichkeit von Ultraschall in der Probenvorbereitung

Die Unbedenklichkeit der Anwendung von Ultraschall wurde für Myoglobin, BSA und Ovalbumin getestet. Hierzu wurde für jedes Protein eine Probenlösung mit der Konzentration von 1 mg/mL in iSEC PBS-Puffer pH 6,8 hergestellt und diese dann in zehn Aliquote zu je 1 mL in Mikroreaktionsgefäße gefüllt. Mittels einer Haltevorrichtung aus Kupferdraht wurden diese 10 Gefäße in das Ultraschallbad eingebracht. Das Bad wurde angeschaltet und nach 0, 5, 10, 15, 20, 25, 35, 45, 60 und 90 Minuten wurde jeweils ein Gefäß entfernt und anschließend mittels iSEC (s. Kapitel 8.1.4.1.2) mit der Biosep® S3000 als Trennsäule vermessen. Detektiert wurde bei 207 nm. Während der Betriebsdauer von 90 Minuten kommt es zu einer Erwärmung des Wassers. Die Durchführung erfolgte für die drei Proteinlösungen ungekühlt und unter Eiskühlung. Die Temperatur wurde dabei stets mittels Kontaktthermometer überwacht. Das mit Eiswasser gekühlte Ultraschallbad wies Temperaturen zwischen 2 °C und 4 °C während der Messung auf. Ohne den Zusatz von Eiswasser erreichte das Ultraschallbad nach 90 Minuten Temperaturen von 54 °C bis 56 °C, bei einer anfänglichen Wassertemperatur von 19 °C bis 21 °C. Trotz der unter 4.2.2 beschriebenen Vorgänge und der relativ hohen erreichten Temperaturen konnte kein eindeutiger Effekt durch die Ultraschallbehandlung erzielt werden.

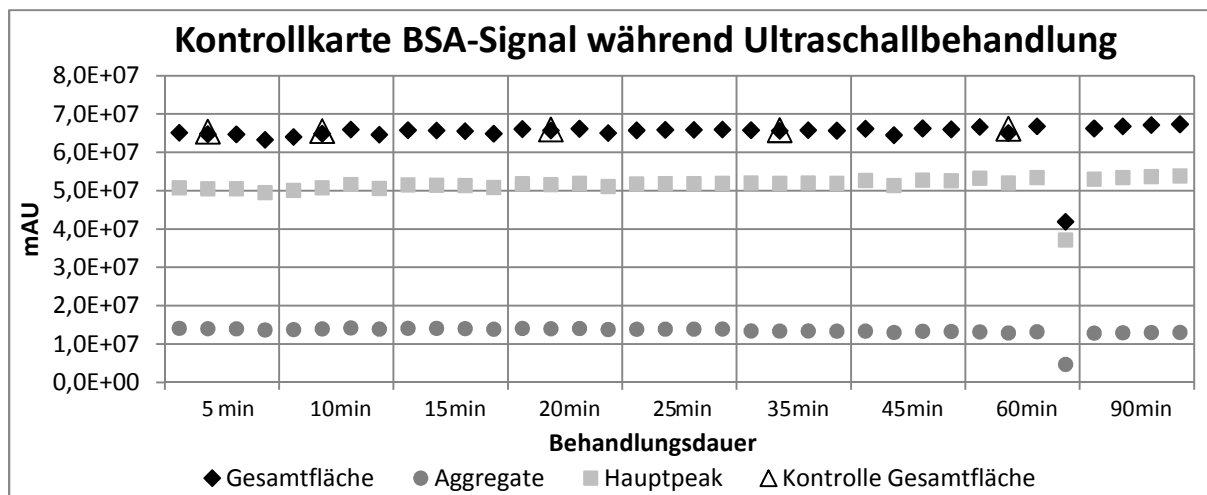


Abbildung 4.16 - Die Kontrollkarte zeigt die Signalfächen von BSA mit unterschiedlicher Behandlungsdauer im Ultraschallbad bei 35 kHz und 240 Watt. Nach 90 Minuten erreichte das Wasser eine Temperatur von 56 °C. Die Dreiecke zeigen die Gesamtflächen von Kontrollinjektionen einer unbehandelten BSA-Probenlösung an, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Sequenz eingebaut waren. Es ist kein Unterschied in der Fläche im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Bei Injektion Nummer 32 handelt es sich um eine Fehlinjektion.

Abbildung 4.16 zeigt in einer Kontrollkarte die Konstanz der Signale von BSA-Probenlösungen, die mit unterschiedlicher Dauer ohne Eiskühlung im Ultraschallbad behandelt wurden. In den Chromatogrammen erscheinen vor dem Hauptsignal Signale von aggregiertem BSA, welche durch Größenkalibration auf 160 - 396 kDa geschätzt wurden. Diese Peaks tauchen in praktisch jedem BSA-Chromatogramm auf, da diese bereits während der Gewinnung des Proteins in Reinform entstehen [27]. Wie Abbildung 4.16 zeigt, nehmen diese über die Zeit von 90 Minuten nicht zu. Die nach der Literatur erwartete Aggregatbildung von BSA blieb also aus. Signale, die auf Probenbestandteile mit geringerem hydrodynamischen Radius als das BSA-Monomer (Fragmente) zurückgehen, machten bei allen Injektionen zwischen 0,10 % und 0,53 % der Gesamtfläche aus und zeigten dabei keinen Trend bei zunehmender Behandlungsdauer.

Die Peakform des Myoglobins jedoch zeigte sich definierter für die Aliquote, die unter Kühlung im Ultraschallbad behandelt wurden (s. Abbildung 4.17).

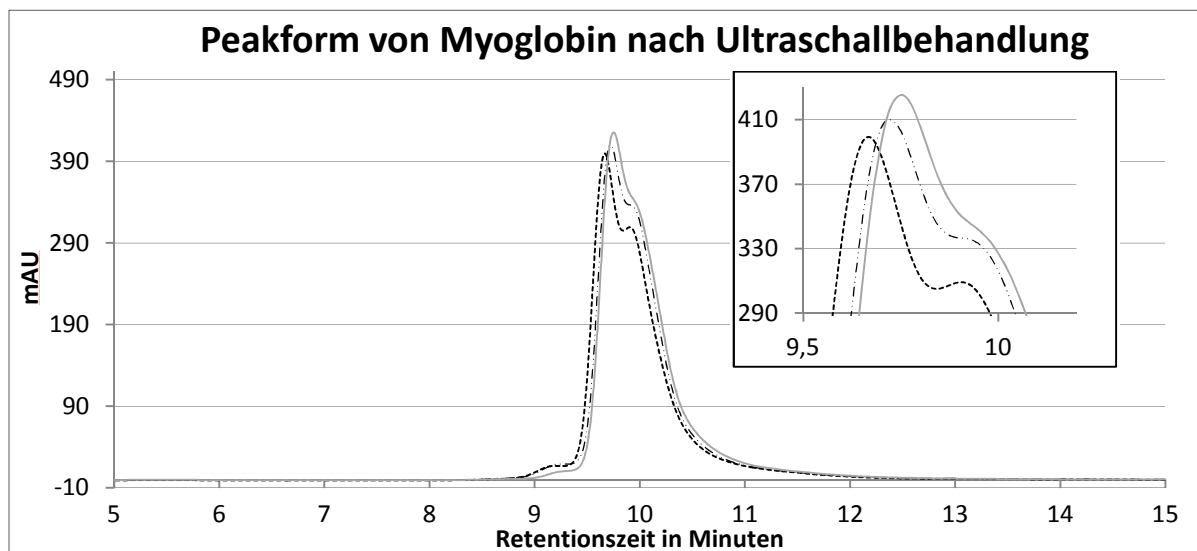


Abbildung 4.17 - Chromatogramme von Myoglobin. Die durchgehende graue Linie zeigt die Peakform nach 90 Minuten im Ultraschallbad ohne Kühlung, mit einer maximalen Temperatur von 54 °C. Die kurzgestrichelte Linie zeigt die Peakform nach 90 Minuten unter Eiskühlung bei maximal 4 °C und die alternierende Linie zeigt Myoglobin ganz ohne Ultraschalleinwirkung. Als Trennsäule diente die Biosep® S3000 von Phenomenex bei einer Flussrate von 1,0 mL/min bei einer Detektionswellenlänge von 207 nm im iSEC Modus.

Dies könnte durch die Konformationsänderung zu einer bei niedriger Temperatur stabilen Isoform erklärt werden. Da sich dieser Effekt jedoch bei ähnlichen Probenvorbehandlungsschritten, wie z.B. einer Kühlschränklagerung, nicht reproduzieren lässt, scheint die Ultraschallbehandlung einen Einfluss auf diese Beobachtung zu haben. Mit zunehmender Behandlungsdauer prägt sich die Peakform stärker aus (s. Abbildung 4.18).

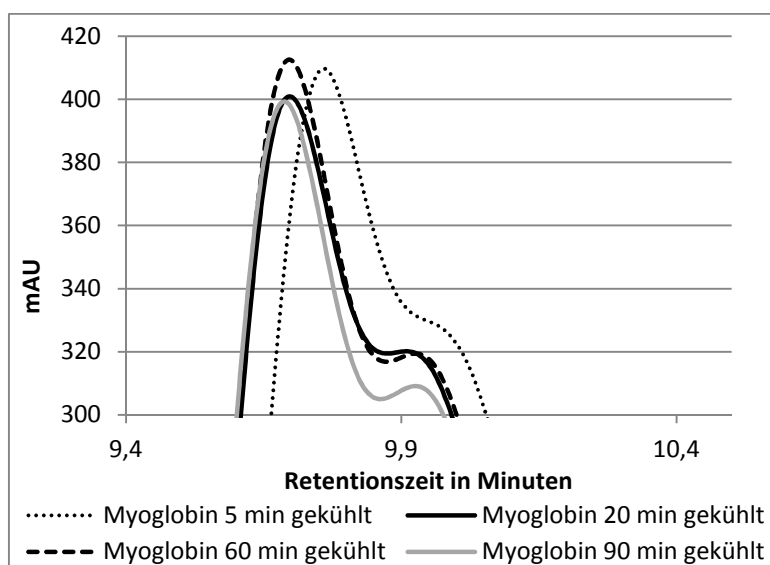


Abbildung 4.18 - Gezeigt sind Vergrößerungen der Signalspitzen im Chromatogramm von Myoglobin nach 5, 20, 60 und 90 Minuten Behandlungsdauer im Ultraschallbad unter Kühlung bei 2 °C bis 4 °C. Man kann erkennen, dass sich mit zunehmender Behandlungsdauer die Schulter des Signals stärker ausprägt. Als Trennsäule diente die Biosep® S3000 von Phenomenex bei einer Flussrate von 1,0 mL/min bei einer Detektionswellenlänge von 207 nm im iSEC Modus.

Die Vorbehandlung proteinhaltiger Proben im Ultraschallbad fällt somit, trotz kontroverser Aussagen der Literatur und starker Erwärmung der Proben, bei längerer Behandlung für die getesteten Proteine unauffällig aus. Eine kurzzeitige Anwendung von weniger als 5 Minuten kann die Lösungsgeschwindigkeit verbessern ohne die Entstehung von Aggregaten oder Fragmenten zu fördern. In jedem Fall erreicht man eine Entgasung der Probenflüssigkeit. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Empfehlung, diesen wenig zeit- und kostenintensiven Schritt der Probenvorbereitung, zwar nicht völlig unkritisch zu betrachten, aber durchaus in Erwägung zu ziehen.

4.2.2.2 Über das Entgasen von Flüssigkeiten

Die bereits in Kapitel 4.2.2 erwähnten stabilen Kavitäten füllen sich in folgenden Unterdruckzonen der nächsten Schwingungen mit gelösten Gasen und Wasserdampf. Hierdurch steigt die Stabilität dieser Kavitäten, während sie sich in der Druckzone befinden. Sie überdauern so eine Vielzahl an Zyklen, wachsen dabei jedoch nur anfangs und stabilisieren sich schließlich um ein bestimmtes Gleichgewichtsvolumen. Diese Blasen steigen vermehrt nach Abschaltung des Ultraschallgenerators auf und verlassen so die Flüssigkeit [126, S. 11].

Daraus ergibt sich ein weiteres Anwendungsgebiet, das Entgasen von Fließmitteln für die HPLC. In der Flüssigkeit gelöste Gase werden hierdurch abgeschieden, was die Wahrscheinlichkeit der Artefaktbildung durch kleinste Luftblasen die den Detektor passieren verringert. Durch die Reduzierung der in wässrigen Lösungen enthaltenen Luft minimiert sich zudem die Gefahr von mikrobiellem Wachstum [132]. Diese Art der Entgasung sollte in Ultraschallbädern erfolgen, die in der Lage sind, ihre Abgabeleistung zu pulsen, um ein Entweichen von entstandenen Gasblasen zu ermöglichen. Andernfalls verharren die Gasblasen in der Lösung und mindern so die Intensität der Schalleistung, wodurch die Entgasung vermindert wird. Ultraschallbäder mit konstanter Abgabeleistung entgasen Flüssigkeiten daher besser, wenn man sie in mehreren Zyklen anschaltet. Andernfalls empfiehlt sich die Entgasung im Vakuum, oder durch das Einleiten von Edelgasen wie Helium. Letzteres ist zwar sehr effektiv, aber unverhältnismäßig teuer. Die Anwendung eines Wittschen Topfes zur Vakuumentgasung ist auch für die Entgasung größerer Volumina geeignet. Das praktikabelste Vorgehen zur Entgasung von größeren Flüssigkeitsvolumina ist aber die Verwendung eines Ultraschallbades geeigneter Größe. Auf diese Weise können in 15 Minuten etwa 2 Liter Eluent entgast werden.

Zwar sollen durch die alleinige Ultraschallbehandlung nur, für die chromatographische Verwendung unzureichende, 30 % an gelösten Gasen entfernt werden können, jedoch zeigte sich in dieser Arbeit die Verwendung von Ultraschall als vollkommen tauglich. Es empfiehlt sich generell, hinter der Durchflussszelle eine rückdruckerhöhende Kapillare anzubringen. Dies unterbindet effektiv ein Ausgasen in der Durchflussszelle des Detektors. Weil sich wieder Gase in der Flüssigkeit lösen sobald das Entgasen beendet ist, sollte bei längeren Sequenzen und empfindlichen Methoden alle fünf bis zehn Stunden wiederholt entgast werden. Nach etwa 12 Stunden kann man davon ausgehen, dass sich wieder so viel Gas in der Flüssigkeit gelöst hat wie zu Beginn vorhanden war [132].

4.2.3 Filtration

Bevor eine Probenlösung in ein Probenvial überführt und zur Messung in die HPLC-Anlage verbracht wird, sollte diese stets filtriert werden, um partikuläre Bestandteile abzuscheiden. Ob dieser Schritt erfolgt, während man die Probe in das Probenvial überführt, z.B. mittels Einwegvorspritzenfilter, oder die Probe als Bulk in ein sorgsam gesäubertes Gefäß gibt von dem aus die Überführung in die Probenvials erfolgt, macht was die Partikelfreiheit angeht, wohl keinen entscheidenden Unterschied aus. Letzteres ist dann sinnvoll, wenn größere Volumina temperaturempfindlicher Proben vorliegen. Ein Großteil der Probe kann während der Messungen dann weiterhin gekühlt gelagert werden. Der Nachteil ist, dass durch den zusätzlichen Umfüllschritt zusätzlicher Oberflächenkontakt zur Probe besteht. Dieser geschieht einerseits durch das zweite Gefäß und andererseits durch die Überführung mittels Mikropipettiergeräten in die Probenvials. Dies kann zu Verlusten durch Adsorption führen (s.a. Kapitel 6.4). In jedem Fall ist darauf zu achten, möglichst sterile Bedingungen zu gewährleisten. Dies gilt besonders bei größenausschlusschromatographischen Verfahren, da die hierbei verwendeten Eluenten und Probenlösungen ein ideales Milieu für Mikroorganismen bilden (s. Kapitel 4.1.4.3). Für die verwendeten Filtermaterialien bedeutet dies die Verwendung von Porengrößen von 0,22 µm. Hierdurch werden eventuell vorhandene Mikroorganismen bzw. Sporen dieser aus der Probenlösung entfernt. Aber auch ungelöste Probenbestandteile werden durch die Filtration entfernt. In der Probenvorbereitung ist dies für die meisten analytischen Methoden durchaus erwünscht, da diese Partikel andernfalls Trennsäulen und Kapillaren blockieren oder sich abscheiden und in der Folge zu einer Biofilmbil-

derung führen könnten, was wiederum zu einer Blockade führen kann. Häufig spielt der absolute Gehalt der Probenlösung bzw. Probensuspension keine Rolle, da es reicht relative Aussagen zu treffen. Aber auch dann stellt sich die Frage ob eine Filtration in die Probenvials die Analysenergebnisse (gleichmäßig) beeinflusst. Um dies zu untersuchen, wurden Filtrationsversuche mit unterschiedlichen Filtermaterialien (s. Kapitel 8.1.2) in Spritzenvorfiltern zur Sterilfiltration durchgeführt. Hierzu wurden 100 mL einer 0,1 % (m/V) BSA-Lösung hergestellt und diese auf vier 25 mL Messkolben aufgeteilt. Die Lösung wurde in eine Spritze durch eine Kanüle aufgezogen und filtriert. Etwa 300 µL dieser Lösung wurden dabei in ein Probenvial überführt. Der Rest der Lösung wurde erneut mit einem neuen Filter bearbeitet. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis eine zehnfach filtrierte Lösung vorlag. Dies wurde für jeweils zwei Filtermaterialien, gemischte Celluloseester (CME) und Polyvinylidendifluorid (PVDF), von jeweils zwei Herstellern durchgeführt. Für alle Filtrationen wurden nur eine Spritze und eine Kanüle verwendet, um die Adsorptionseffekte hierdurch möglichst gering zu halten. Anschließend wurden die Proben mittels ISEC (s. Kapitel 8.1.4.1.2) mit der Biosep® S3000 als Trennsäule vermessen. Detektiert wurde bei 214 nm.

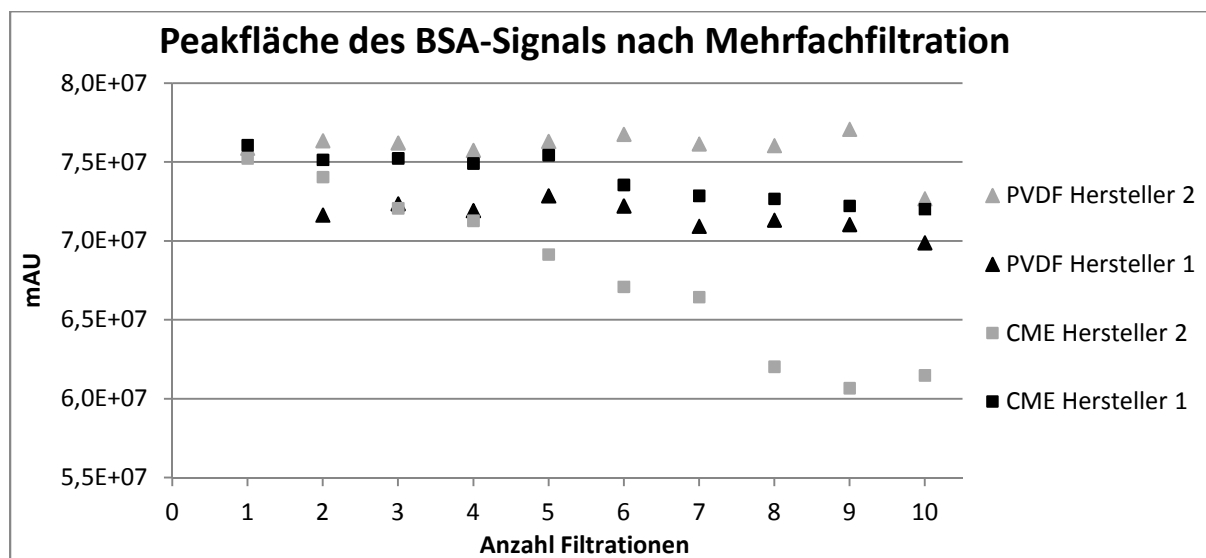


Abbildung 4.19 - zeigt die Gesamtflächen der Signale von BSA nach mehrfacher Filtration durch Spritzenvorfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm von zwei unterschiedlichen Herstellern. Von jedem Hersteller wurde PVDF und CME als Filtermaterial getestet. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Materialien und der Hersteller.

Abbildung 4.19 zeigt, dass für die Filtration von proteinhaltigen Proben PVDF gegenüber CME der Vorrang zu geben ist. Die CME-Filter beider Hersteller zeigen adsorptionsbedingte Probenverluste, die bei erneuter Filtration durch den dargestellten Trend deutlich erkennbar

sind. Die einfach mit PVDF-Filtern von Hersteller 1 gefilterte Probe zeigte in 4 Injektionen keine auswertbaren Signale. Dies ist wohl eher auf einen Geräte- oder Methodenfehler zurückzuführen, als dass es an der Filtration liegt, da Chromatogramme nachfolgender Proben (Filtrationen) gut auswertbare Signale ergaben. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Flächen dieser Messreihe zwar stabil sind, also keine detektierbare Absorption zeigen, jedoch unter den Werten für die PVDF-Filter von Hersteller 2 bzw. der jeweils ersten CME-Filtrationen liegen. Da es sich um dieselbe Probenlösung handelt und nur eine Spritze verwendet wurde, handelt es sich hierbei um einen Effekt durch den Messkolben dieser Probenreihe.

Die Hersteller geben für Filtermaterialien die durchschnittliche Proteinadsorption pro Oberfläche an. Für CME liegt diese bei beiden Herstellern bei $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, für PVDF mit $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ deutlich niedriger. Bei einem Durchmesser von 25 mm ergibt sich eine Fläche von jeweils $4,9 \text{ cm}^2$, also eine Gesamtmenge von $19,6 \mu\text{g}$ pro PVDF-Filter und $735 \mu\text{g}$ für CME.

Abbildung 4.19 zeigt für die Filtrationen durch CME von Hersteller 2 über zehn Filtrationen eine Abnahme der gesamten Signalfläche von etwa 20 %. Hieraus kann die gesamte durch Filtration bedingte Adsorption geschätzt werden. Bei einer ursprünglichen Probenkonzentration von $1,0 \text{ mg/mL}$ und einem Probenvolumen von 25 mL bedeutet das eine pro Filtration durchschnittlich adsorbierte Proteinmenge von $555 \mu\text{g}$. Für die CME-Filter von Hersteller 1 ergibt sich bei einer Abnahme des Signals um etwa 5 % eine durchschnittlich adsorbierte Menge von $139 \mu\text{g}$ pro Filtration. Jedoch wird bei dieser Berechnung vernachlässigt, dass der Bezugswert bereits aus einer einfach filtrierte Probe erhalten wird. Beide Werte liegen danach jedoch unter den Herstellerangaben. Die Adsorption an den PVDF-Materialien fiel geringer aus als für CME. Jedoch wird hieraus zum einen der Unterschied des gleichen Materials unterschiedlicher Hersteller und der zwischen den Materialien deutlich. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Bearbeitung von Proteinen stets unter Sterilfiltration erfolgen soll, um Gerätebauteile und Trennsäulen zu schonen und deren Lebensdauer zu erhöhen. Außerdem werden hierbei Pilzsporen und Mikroorganismen zurückgehalten, die zu einem Probenverderb führen können. PVDF zeigt sich erwartungsgemäß als besser für Proteine geeignet und sollte bevorzugt werden. Bei einem Wechsel des Herstellers sollte der Einfluss auf das Analysenergebnis überprüft werden.

5 Analytik einer halbfesten Arzneimittelzubereitung

Ein zentraler Teil dieser Arbeit war die Untersuchung der Qualität einer halbfesten Zubereitung zur Behandlung der Rosacea, einer chronischen und häufig auftretenden Hauterkrankung. Sie weist, je nach Hauttyp, in Europa eine Prävalenz zwischen 2 % und 10 % auf [133]. Die Krankheitsentstehung ist bislang nicht im Detail bekannt. Daher beruht die Therapie auf empirischen Methoden sowie der Meidung von patientenindividuellen Triggern bei bereits bestehender Erkrankung. Zu letzteren zählen häufig UV-Strahlung oder gewisse Kosmetika. Generell vermieden werden sollten irritierende Stoffe, wie alkoholhaltige Lösungen oder adstringierende Stoffe [133]. Zur topischen Therapie der Rosacea zugelassen sind Azelainsäure und Metronidazol, da hierfür valide Studien mit guten Ergebnissen vorliegen. Aber auch andere Antibiotika wie Clindamycin, Erythromycin oder Tetrazykline werden erfolgreich topisch angewandt [133, 134]. Bei schwereren Erkrankungsformen wird zusätzlich durch oral verabreichte Antibiotika therapiert. Eine Zulassung besitzt Doxycyclin in einer nicht antibiotisch wirksamen Dosierung. Es wird vermutet, dass in dieser niedrigeren Dosierung Doxycyclin durch Zytokinhemmung antiinflammatorisch wirkt und, weil keine Antibiose erreicht wird, auch keine Resistenzbildung erfolgt [134]. Ein antiinflammatorischer Effekt wird auch für andere topisch angewandte Antibiotika vermutet. Die ebenfalls stark antiinflammatorisch wirkenden und hochpotenten Glucocorticoide hingegen sind nur in besonders schweren Fällen, wie der Rosacea fulminans, als Kurzzeittherapeutikum geeignet. Die Anwendung bei leichteren Verlaufsformen verschlechtert das Krankheitsbild [135].

Die Kombination von Metronidazol und Erythromycin in einer gemeinsamen halbfesten Zubereitung zur Therapie der Rosacea erscheint daher berechtigt. Folglich wird diese Wirkstoffkombination häufig von Ärzten verordnet. Obwohl es eine geprüfte Formulierung für diese Kombination im Neuen Rezeptur Formularium (NRF) gibt, wird häufig davon abgewichen. Diese Abweichungen werden in Fachkreisen vielfach diskutiert. Schließlich ist die Qualität dieser Zubereitungen auf Grund von vorliegenden Inkompatibilitäten der Wirkstoffe nicht gesichert; auf der anderen Seite steht der Behandlungserfolg mit solch frei komponierten Zubereitungen. Grund für die Inkompatibilität sind die sich nicht überlappenden Stabilitätsoptima des pH-Wertes. Metronidazol ist von pH 4 bis 6 stabil. Erythromycin von pH 8 bis 8,5 [136]. Es soll hier gezeigt werden, ob ein Abweichen von der standardisierten Rezeptur des NRF möglich ist und sinnvoll sein kann. Hierzu wurden am Institut für pharmazeutische

Technologie im Rahmen eines Wahlpflichtfaches diverse Zubereitungen hergestellt, welche sich in der Zusammensetzung der Grundlage sowie in der Art und Weise der Herstellung unterscheiden. Diese Zubereitungen wurden in Abhängigkeit der Lagerungstemperatur und -zeit untersucht. Hierzu wurde zunächst die Matrix der Zubereitung möglichst vollständig entfernt, um anschließend mittels HPLC und CE Erkenntnisse über die Qualität zu erlangen.

5.1 Matrices

Halbfeste Arzneimittelzubereitungen bestehen generell aus zwei grundlegenden Komponenten, einer Grundlage und den zu verarbeitenden Wirkstoffen. Halbfeste Zubereitungen zur topischen Anwendung existieren in einer sehr großen Vielfalt. Der Großteil dieser dient kosmetischen Zwecken und ist daher frei von verschreibungspflichtigen Wirkstoffen. Zubereitungen, die verschreibungspflichtige Wirkstoffe enthalten, zählen stets zu den Arzneimitteln. Eine Überschneidung der Gruppen Arzneimittel und Kosmetika ist jedoch die Regel, was eine genaue Abgrenzung nicht zulässt.

Einige der im Neuen Rezeptur Formularium geführten Zubereitungsgrundlagen sind komplexe Gemische aus mehreren Komponenten (z.B. Basiscreme DAC, Wasserhaltige Hydrophile Salbe DAB¹, Wollwachsalkoholsalbe DAB). Diese lassen sich bereits fertig von Großhändlern beziehen. In der Offizin werden diese dann häufig durch weitere Komponenten, welche Einfluss auf die therapeutischen Eigenschaften nehmen sollen, ergänzt. Hierzu zählen etwa Penetrationsverbesserer, Lokalanästhetika, kühlende Zusätze und Wirkstoffe. Andere Zusätze wie Konservierungsmittel wirken sich positiv auf die Patientencompliance aus, da ein Medikament mit kurzer Haltbarkeit auch nur einen begrenzten Therapiezeitraum zulässt und eine lange Haltbarkeit in den Augen vieler Patienten für eine gute "frische" Zubereitung steht. Der verschreibende Arzt wählt eine für die therapeutische Indikation passende Grundlage und ergänzt diese ggf. um weitere Bestandteile. Der zuständige Apotheker hat die Aufgabe, die Rezeptur auf eventuelle Inkompatibilitäten und auf Zweckhaftigkeit der Komposition zu prüfen und diese danach herzustellen [137, S. 6]. In Sammelwerken wie dem Neuen Rezeptur Formularium sind für viele Indikationen und Wirkstoffe gut untersuchte und etablierte Kompositionen von Zubereitungen gelistet. Sammelwerke wie dieses erleichtern es

¹ Im Jahr 2015 erfolgte eine Änderung der Bezeichnung auf Anionische Hydrophile Creme. In dieser Arbeit wurde mit Produkten gearbeitet welche die alte Nomenklatur trugen. Daher wird auch diese verwendet.

Arzt und Apotheker Arzneimittel mit gleichbleibend hoher Qualität auszuwählen und herzustellen. Bei einer Abweichung davon ist Vorsicht geboten. Im Einzelfall kann selten vorausgesagt werden, ob die Zubereitung nach Herstellung den Anforderungen genügen wird, da sich sehr viele Faktoren auf die Qualität der Zubereitung auswirken.

Eine genaue Untersuchung der Qualität von freikomponierten Zubereitungen ist jedoch auf Grund fehlender Geräte und Erfahrung in der Offizin kaum möglich. Wie bereits angesprochen, fehlt dem Patienten erst recht die Möglichkeit, sich von der Qualität von Arzneimitteln zu vergewissern. Eines der zentralen Probleme bei der Analyse einer halbfesten Zubereitung ist die wirkstoffumgebende Matrix. Diese muss vor Analyse der Wirkstoffe selektiv abgetrennt werden, da sonst das Analysenergebnis verfälscht würde. Bei der Entwicklung einer solchen Methode muss daher die Zusammensetzung der Grundlagen bedacht werden.

Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit untersuchten Zubereitungen wurden aus fertigen, halbfesten Grundlagen hergestellt, welche vom Großhandel bezogen wurden. Es wurden grundsätzlich zwei Grundlagen verwendet, die Basiscreme DAC und Hydrophile Salbe mit folgenden Zusammensetzungen:

Basiscreme DAC (BC)

Inhaltsstoff	Prozentualer Anteil
Glycerol-Monostearat 60	4,0
Cetylalkohol	6,0
Mittelkettige Triglyceride	7,5
Weißes Vaseline	25,5
Macrogol-20-glycerolmonostearat	7,0
Propylenglycol	10,0
Gereinigtes Wasser	40,0

Hydrophile Salbe

Inhaltsstoff	Prozentualer Anteil
Emulgierender Cetylstearylalkohol (Lanette N)	30,0
Paraffinum Subliquidum	35,0
Weißes Vaseline	35,0

Durch Zusatz einer Pufferlösung und von Konservierungsstoffen wurden die eigentlichen Grundlagen für die Zubereitungen präpariert:

Wasserhaltige Hydrophile Salbe mit Sorbinsäure und Kaliumsorbat (WHSS)

Inhaltsstoff	Prozentualer Anteil
Hydrophile Salbe	30,0
Gereinigtes Wasser	70,0
Sorbinsäure	< 1,0
Kaliumsorbat	< 1,0

Wasserhaltige Hydrophile Salbe mit Propylenglycol (WHSP)

Inhaltsstoff	Prozentualer Anteil
Hydrophile Salbe	27,5
Gereinigtes Wasser	58,0
Propylenglycol	14,5

NRF 11.138 mit Pufferzusatz (NRF)

Inhaltsstoff	Prozentualer Anteil
Mittelkettige Triglyceride	3,0
Basiscreme	47,5
Zitronensäurelösung 0.5 %	12,1
Propylenglycol	10,1
Gereinigtes Wasser	27,3

NRF 11.138 ohne Pufferzusatz (NRF WCS)

Inhaltsstoff	Prozentualer Anteil
Mittelkettige Triglyceride	3,1
Basiscreme	55,6
Propylenglycol	11,9
Gereinigtes Wasser	29,4

Die etwas unrunderen Zahlen der prozentualen Anteile der Bestandteile für die NRF 11.138-Rezepturen ergeben sich, weil hier zur besseren Übersicht der Anteil der Wirkstoffe an der Zubereitung herausgelassen wurden. In der Rezeptur des Neuen Rezeptur Formulariums ist

dieser Anteil berücksichtigt. Diese machten für alle Zubereitungen einen Massenanteil von 3,0 % aus.

5.2 Unterschiede in der Galenischen Qualität

Um Erkenntnisse über die galenische Qualität zu erhalten, wurde am Institut für pharmazeutische Technologie die Größe von Partikeln mittels Grindometer und Polarisationsmikroskop untersucht.

Die Wirkstoffe sollten anhand von Referenzbildern aus den wässrigen Suspensionen der Wirkstoffe identifiziert werden (s. Abbildung 5.1 bis Abbildung 5.4).

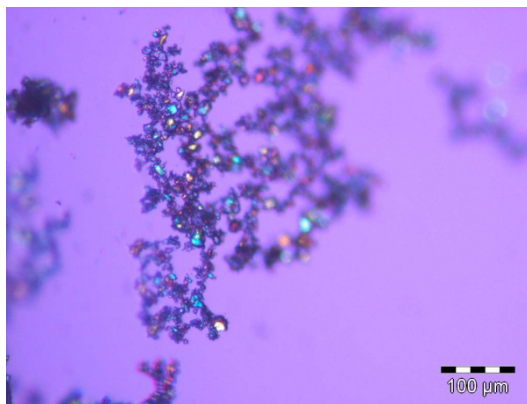


Abbildung 5.1 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Erythromycin in Wasser (2 %).

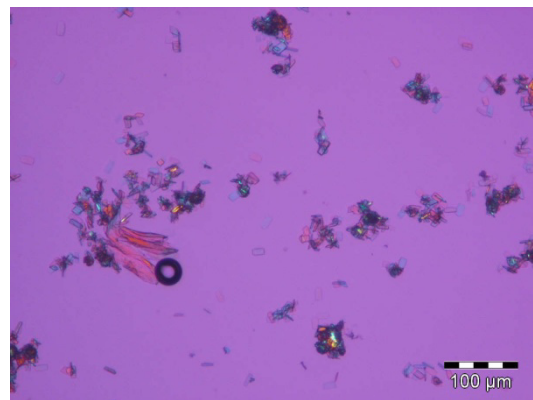


Abbildung 5.2 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Erythromycin in Wasser und Propylenglykol (2 %).

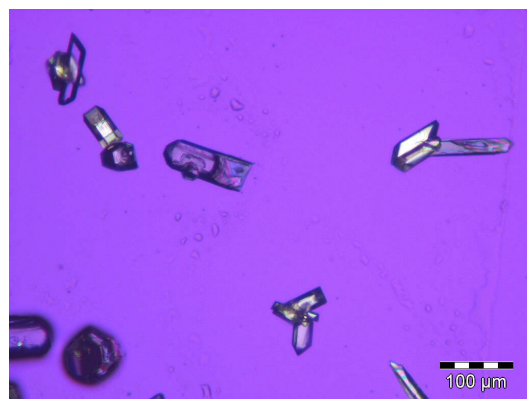


Abbildung 5.3 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Metronidazol in Ethanol (1 %).

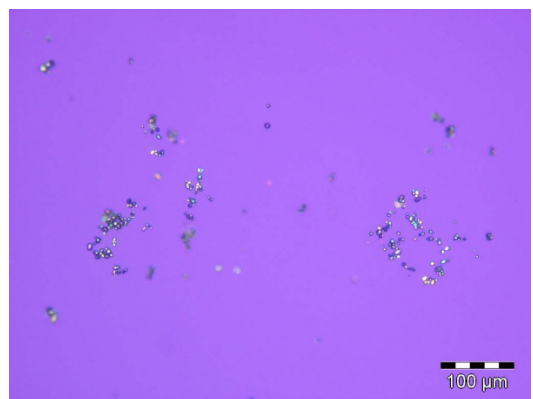


Abbildung 5.4 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Metronidazol in Wasser (1 %).

Erkennbar ist der Größenunterschied der einzelnen Wirkstoffpartikel in wässriger Suspension. Erythromycin und Metronidazol unterscheiden sich außerdem bezüglich ihrer Kristallform wenn sie mit Propylenglykol bzw. Ethanol versetzt werden.

Eine spätere Unterscheidung in den Zubereitungen ist jedoch deutlich komplizierter als in den Suspensionen, so dass eine vollständig sichere Zuordnung so nicht sicher gewährleistet werden kann.

5.2.1 Sandwichverfahren vs. manuelles Anreiben

Bei der manuellen Verarbeitung von Wirkstoffen mittels Fantaschale und Pistill empfiehlt sich das Anreiben des Wirkstoffes mit lipophilen, inerten Ölen wie Miglyol® (Neutralöl) in einer Fantaschale. Hierdurch werden Wirkstoffkristalle zerkleinert und mit dem neutralen Öl benetzt. Dies erschwert die Aggregatbildung der Wirkstoffe, da die partikelumschließende Ölschicht eine fest-fest-Oberflächenadhäsion unterdrückt [138].

Anreiben von Erythromycin in Propylenglykol ist hingegen problematisch, da sich der Wirkstoff in Propylenglykol löst und dann in der Zubereitung wieder auskristallisiert.

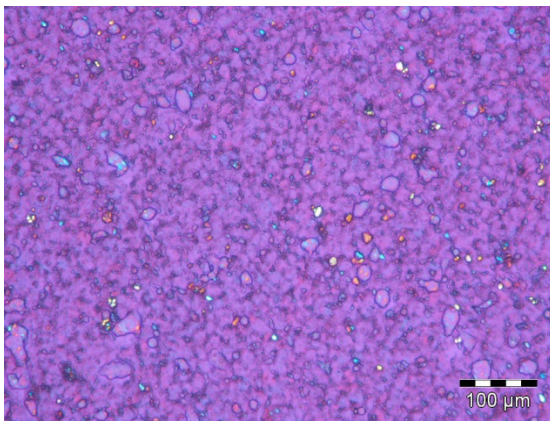


Abbildung 5.5 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Erythromycin in Basiscreme unmittelbar nach Herstellung. Der Wirkstoff wurde mit Miglyol® in einer Fantaschale mittels Pistill angerieben.

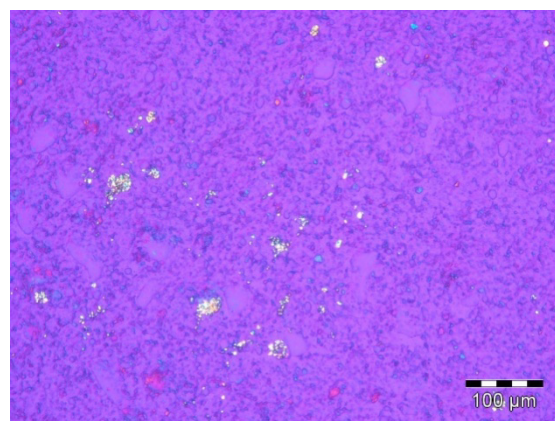


Abbildung 5.6 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Erythromycin in Basiscreme unmittelbar nach Herstellung mittels TopiTec® im Sandwichverfahren. Wirkstoffnester von bis zu 50 µm sind vorhanden.

Die beiden Wirkstoffe sind generell schlecht benetzbar. Im Gegensatz zu diesem Verfahren gibt es die Möglichkeit den Wirkstoff bei der maschinellen Verarbeitung mittels TopiTec® zwischen zwei Schichten von Grundlage einzuschließen (Sandwichverfahren). Der Unterschied beider Verfahren ist in Abbildung 5.5 und Abbildung 5.6 dargestellt. Die so präparierte Zubereitung wird dann direkt verrührt. Dies führt jedoch teilweise zu einer Adhäsion von festen Wirkstoff am Krukendeckel und an der Werkzeugwelle [138], woraus ein effektiver Mindergehalt resultiert. Bei der Herstellung im Sandwichverfahren wurden größere Wirkstoffnester festgestellt als bei manueller Herstellung nach anreiben in Miglyol®.

5.2.2 Vermeiden der Artefaktsichtung

Die Grundlagen wurden außerdem auch ohne Zugabe von Wirkstoff betrachtet um Artefakte vorab zu erkennen. Dabei ergab sich die Beobachtung die in Abbildung 5.7 dargestellt ist.

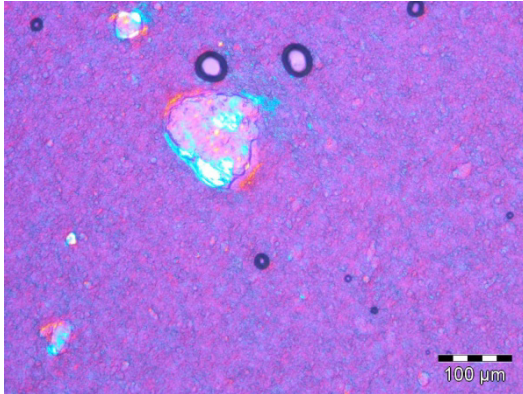


Abbildung 5.7 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Basiscreme DAC betrachtet im Polarisationsmikroskop. Teilweise werden farbige Strukturen sichtbar, die auf doppelbrechende Bestandteile in dieser Grundlage schließen lassen.

Das Vorhandensein dieser Erscheinung ohne eine Zugabe kristalliner Stoffe ist offenbar bedingt durch chirale Strukturen in der BC, da Doppelbrechung sonst in der Regel nur bei optisch anisotropen Kristallen beobachtet wird. Jedoch sind auch andere chirale Stoffe in der Lage Doppelbrechung zu verursachen und so diese Beobachtung zu erklären, wie es hier der Fall ist. Artefaktstrukturen dieser Art konnten auf diese Weise als Wirkstoff ausgeschlossen werden.

5.2.3 Temperaturwechsel und Kühlung

Die Zubereitungen wurden auf zwei unterschiedlichen Wegen hergestellt. Zum einen händisch mittels Fantaschale und Pistill, zum anderen durch ein automatisches Rührsystem (TopiTec® Automatic). Bei der Untersuchung der Partikelgrößen in den Zubereitungen wurde beobachtet, dass Zubereitungen, die bei niedrigeren Drehzahlen im TopiTec® hergestellt wurden, weniger Kristallwachstum aufweisen als es bei hochtourig hergestellten Zubereitungen der Fall ist. Dies ist zu erklären durch den Wärmeeintrag den das Rührwerkzeug verursacht. Durch die entstehende Reibung zwischen Zubereitung und Mischscheibe wird die Zubereitung erwärmt. Die Erwärmung der Grundlage durch das Rührwerkzeug wurde für unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten unter Verwendung eines Infrarot-Thermometers untersucht (s. Abbildung 5.8).

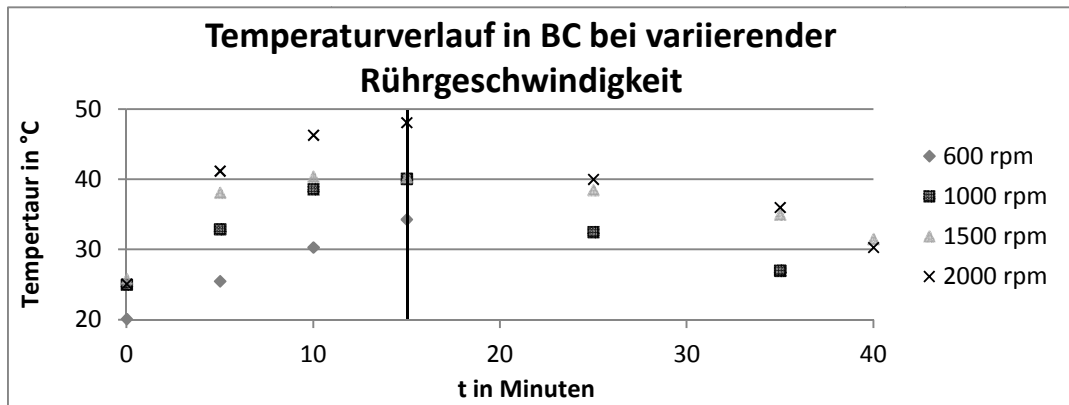


Abbildung 5.8 - Darstellung des Temperaturverlaufes einer Basiscreme gegen die Zeit. Die Rührgeschwindigkeit wurde variiert. Das Rührsystem bestand aus einem TopiTec® mit Standardmischscheibe. Es wurde jeweils für 15 Minuten gerührt (s. Vertikale Linie im Diagramm).

Es wurden Temperaturen von bis zu 48 °C nach 15 Minuten für eine Rührgeschwindigkeit von 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) beobachtet. Je höher die Rührgeschwindigkeit gewählt wurde, desto stärker fiel der Temperatursprung zu Beginn der Verarbeitung aus. Bei einer Drehzahl von nur 600 rpm hingegen verlief der Temperaturanstieg nahezu linear.

Durch die Erwärmung gehen die Wirkstoffe in der halbfesten Grundlage vermehrt in Lösung. Nach der Herstellung kühlt die halbfeste Zubereitung wieder ab, wodurch das Löslichkeitsprodukt unterschritten wird und die Wirkstoffe in Wirkstoffnestern auskristallisieren (s. Abbildung 5.9). Dies wird forciert durch eine gekühlte Lagerung (s. Abbildung 5.10).

Um diesem Effekt entgegenzuwirken, kann die Zubereitung vor und während der maschinellen Verarbeitung mit einer Kühlmanschette temperiert werden (s. Abbildung 5.11). Jedoch liefert die Herstellung bei erniedrigter Drehzahl ebenfalls zufriedenstellende Ergebnisse bei geringerem Aufwand (s. Abbildung 5.12).

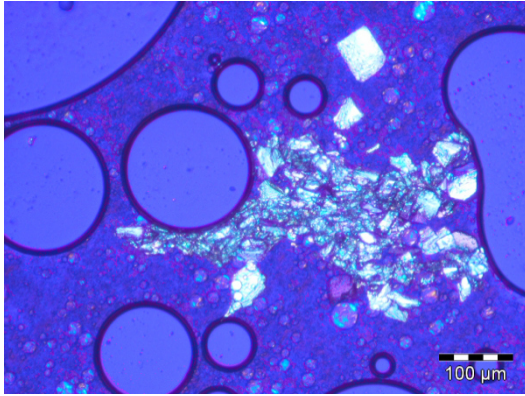


Abbildung 5.9 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Basiscreme mit Metronidazol (1 %) unmittelbar nach Herstellung im TopiTec® bei 2000 rpm für 4 Minuten.

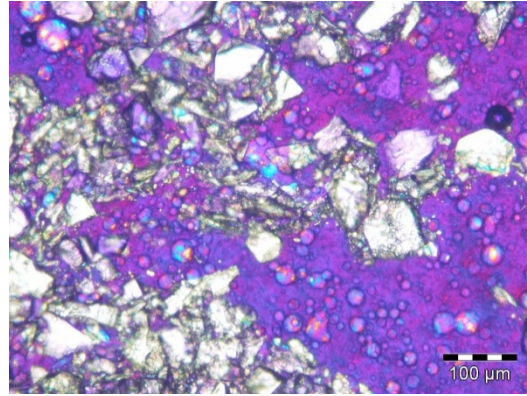


Abbildung 5.10 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Basiscreme mit Metronidazol (1 %). Die Herstellung erfolgte mittels TopiTec® bei 2000 rpm für 4 Minuten mit anschließender Kühlschranklagerung.

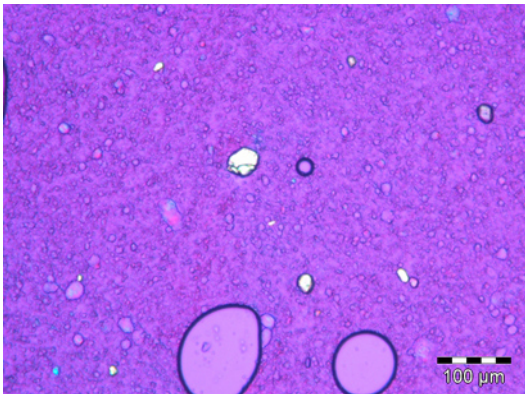


Abbildung 5.11 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Basiscreme mit Metronidazol (1 %). Die Herstellung erfolgte im TopiTec® bei 1500 rpm für 4 Minuten unter Verwendung einer Kühlmanschette mit anschließender Kühlschranklagerung.

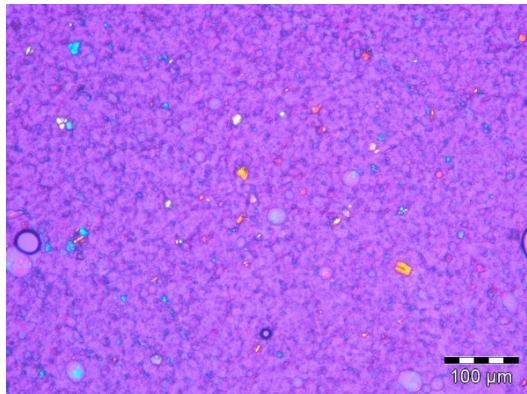


Abbildung 5.12 - Polarisationsmikroskopische Aufnahme. Basiscreme mit Metronidazol (1 %) und Erythromycin (2 %). Die Herstellung erfolgt im TopiTec® bei 500 rpm für 12 Minuten bei anschließender Raumtemperaturlagerung.

Daraus ergibt sich die Empfehlung unter Verwendung einer Kühlmanschette zu arbeiten, vor allem wenn die Zubereitung nach Fertigstellung gekühlt gelagert werden muss. In der Rezeptur NRF 11.138 wird die Lagerung im Kühlschrank empfohlen, um die ohnehin schon labile Wirkstoffkombination vor Zersetzung zu bewahren. Unter diesen Bedingungen gibt das NRF eine Lagerdauer von 4 Wochen für diese Zubereitung an [136, S. 3].

Wie jedoch die Stabilitätsuntersuchungen zeigen, ist die Herstellung und Lagerung bei Raumtemperatur die praktikablere Herstellungsvariante ohne sich dabei negativ auf den Wirkstoffgehalt oder das Kristallwachstum auszuwirken (s. Kapitel 5.6 und Abbildung 5.12).

5.3 Extraktion

Zur störungsfreien Quantifizierung wurden so viele Matrixbestandteile wie möglich entfernt. Für eine flüssigchromatographische Untersuchung ist eine partikelfreie, klare Probelösung erforderlich, um die Trennsäule nicht zu beschädigen. Es müssen daher feste bzw. hochviskose Bestandteile aus den halbfesten Zubereitungen entfernt werden. Diese weisen in den untersuchten Zubereitungen zum großen Teil stark lipophile Eigenschaften auf, weswegen hierzu eine flüssig-flüssig Extraktion mit Heptan gegen Ethanol gewählt wurde. Die halbfeste Zubereitung wurde hierbei erst mit Heptan versetzt und in einem Scheidetrichter geschüttelt. Anschließend wurde Ethanol (99,8 %) zugesetzt. Nach Abtrennung der hydrophilen Phase wurde die lipophile Phase erneut mit Ethanol versetzt und geschüttelt. Die hydrophilen Phasen wurden vereint und nach Filtration als Probelösung verwendet. In Heptan lösen sich hierbei die lipophilen Bestandteile der halbfesten Zubereitung während sich im ethanolischen Anteil sowohl Metronidazol ($> 5 \text{ mg/ml}$) als auch Erythromycin ($> 1 \text{ g/ml}$), aber auch hydrophile Hilfsstoffe wie Zitronensäure oder Kaliumsorbat lösen. Mit Ausnahme der Konservierungsmittel Kaliumsorbat und Sorbinsäure verfügen keine weiteren hydrophilen Bestandteile über nennenswerte Chromophore. Da die Konservierungsmittel nur in sehr geringer Konzentration ($< 0,1 \%$) in den halbfesten Zubereitungen vorliegen, stören diese die Detektion mittels HPLC-UV bzw. DAD nicht. Zu beachten ist die latente Löslichkeit von Ethanol in Heptan, welche die zur Extraktion notwendige Phasentrennung verhindern kann. Dies geschah beim zweiten Ethanolzusatz während der Extraktion. An dieser Stelle war es notwendig eine kleine Menge Wasser zuzusetzen um eine Phasentrennung zu erreichen. Die in der halbfesten Zubereitung enthaltene Wassermenge ist ausreichend, um bei der ersten Ethanolzugabe zu einer Phasentrennung zu führen.

5.4 Chromatographie

Als Grundlage für die Methodenentwicklung wurde uns freundlicherweise vom Zentrallaboratorium (Abteilung: Neues Rezeptur Formularium) eine HPLC-Methode zur Verfügung gestellt. Diese wurde auf eine monolithische RP18e-Phase übertragen und auf kurze Retentionszeiten optimiert, um dem hohen Probenaufkommen der Versuchsreihe gerecht werden zu können (s. Kapitel 8.1.3.2).

Es wurden zwei monolithische Säulen (jeweils 100 mm x 4,6 mm) mittels *Column coupler* verbunden und so die Anzahl der theoretischen Böden nahezu verdoppelt. Das monolithische Säulenmaterial erlaubte trotz der Kopplung noch erhöhte Flussraten, so dass die Trennungen mit 2,0 mL/min durchgeführt und so die Laufzeit einer Messung verkürzt werden konnte. In der ursprünglichen Methode wurde Erythromycin nach 11-13 Minuten detektiert. In der durch die Monolithen optimierten Methode erfolgt die Elution bereits nach etwa 3,5 Minuten. Nach der Optimierung konnten so alle relevanten Peaks in 6 Minuten Laufzeit erfasst werden. Um Erythromycin zu erfassen, muss bei einer Wellenlänge von 200 nm gemessen werden, um eine für das Molekül ausreichend nachweisstarke und empfindliche Methode zu erhalten. Grund hierfür ist das schwache Chromophor und die Notwendigkeit nicht-aromatische π - und n-Elektronen zur Detektion zu verwenden (s. Abbildung 3.2). Bei 200 nm wird jedoch der aus der flüssig-flüssig Extraktion in der Probelösung befindliche Ethanol erfasst, welcher mit dem Metronidazolsignal leicht coeluiert (s. Abbildung 5.13). Auf Grund der hohen Polarität von Metronidazol ist eine vollständige Basislinientrennung hier an einen sehr hohen Anteil wässriger Phase im Fließmittel geknüpft. Hierdurch würde sich der Erythromycinpeak jedoch stark zu höheren Retentionszeiten verlagern und das ohnehin schon geringe Signal auf Grund von Diffusionsprozessen in der Säule noch weiter auseinandergezogen werden. Um dem hohen Probenaufkommen gerecht werden zu können, wurde die leichte Überschneidung in Kauf genommen. Da der Anteil des Ethanols konstant ist, ist die Beeinflussung der integrierten Metronidazolfläche vernachlässigbar. Zur Berechnung der Fläche wurde mit Hilfe der Integrationssoftware EZChromElite (Version 2.2.3 SP2) der ideale Punkt für den Split gesucht und die Flächen so auseinandergehalten.

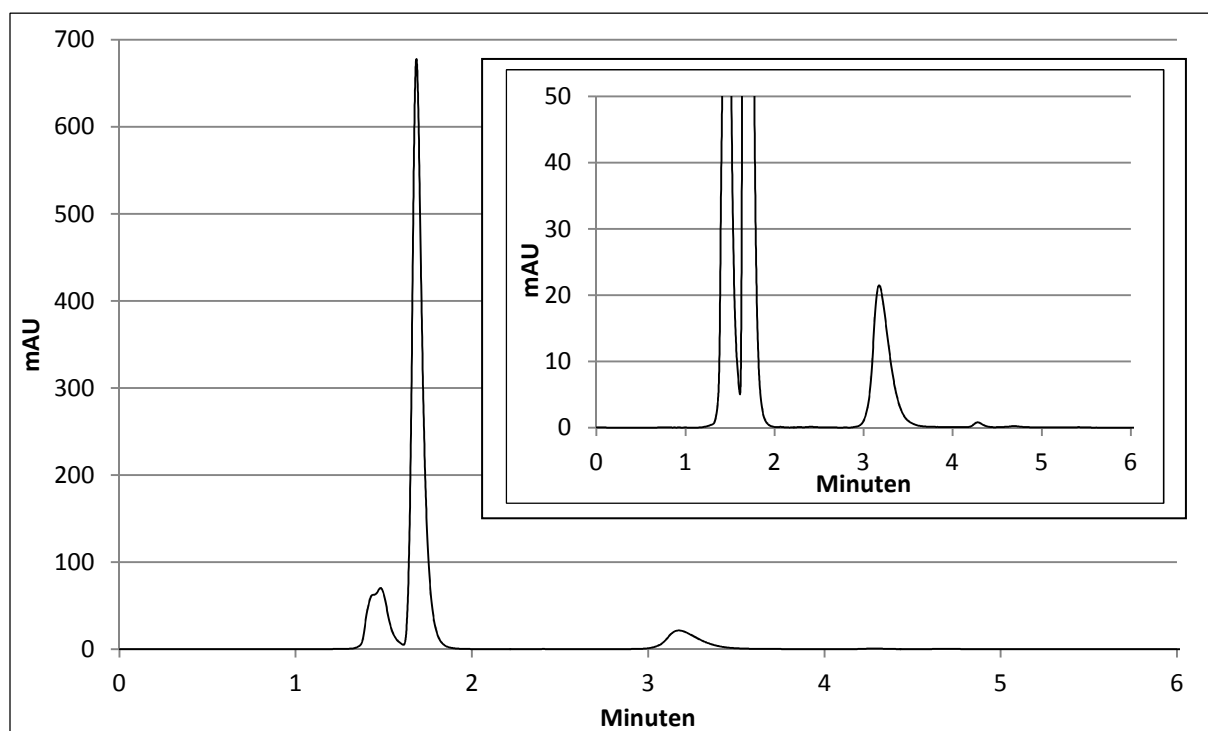


Abbildung 5.13 - Repräsentatives Chromatogramm einer halbfesten Zubereitung nach flüssig-flüssig Extraktion. Zur Methode s. Kapitel 8.1.3.2. Metronidazol (1,68 Minuten) coeluiert hier leicht mit dem durch Ethanol verursachten Injektionspeak bei 1,48 Minuten. Erythromycin erscheint bei 3,17 Minuten (s. Vergrößerungskasten). Der kleinere Peak bei 4,28 bzw. 4,70 Minuten wird vermutlich durch ein Zersetzungsprodukt von Erythromycin (Pseudoerythromycin-A-hemiketal) verursacht (s. Abbildung 5.14).

Der in der Ausgangsmethode saure pH des Fließmittels wurde für eine höhere Stabilität v.a. des Erythromycins auf pH 7 angehoben. Hierdurch wird Erythromycin hydrophobisiert, was jedoch nicht zu einer Erhöhung der Retentionszeit führte, auch weil bei diesem pH-Wert der Anteil der protonierten Form des Moleküls gering ist. Basische Verbindungen führen auf Umkehrphasen häufig zu ausgeprägtem Tailing (Symmetriefaktor $A_s > 1$), was an der Wechselwirkung der Wirkstoffkationen mit freien Silanolat-Funktionen der stationären Phase liegt. Wie in Abbildung 5.13 dargestellt, zeigt der Erythromycinpeak nur ein leichtes Tailing ($A_s = 2,3$), vornehmlich verursacht durch Diffusionsprozesse.

5.4.1 Zuordnung von Erythromycin-Hydrolyseprodukten

Bei 4,28 Minuten kann ein Hydrolyseprodukt von Erythromycin detektiert werden (s. Vergrößerungskasten Abbildung 5.13). Es handelt sich hierbei vermutlich um Pseudoerythromycin-A-hemiketal. Die Annahme beruht auf der Herstellung möglicher Hydrolyseprodukte durch trockenes Erhitzen von Erythromycin und anschließendem Vermessen mittels HPLC. Im Kommentar zur Arzneibuchmonographie von Erythromycin wird beschrieben, welche

Hydrolyseprodukte sich auf diese Weise erzeugen lassen [53, S. 4]. Die Strukturformeln der Verbindungen wurden mit BioChemdraw 13.0 formuliert und so die theoretischen logP-Koeffizienten berechnet. Hieraus ergab sich die Retentionsreihenfolge der Verbindungen (s. Abbildung 5.14).

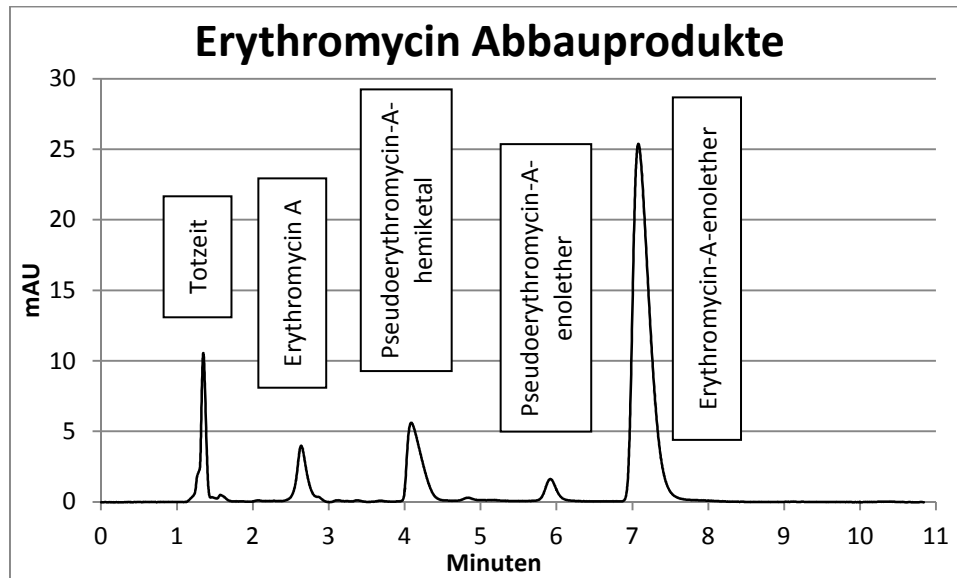


Abbildung 5.14 - Chromatogramm der Zersetzungsprodukte von Erythromycin mit Zuordnung der Substanzen.

Auf diese Weise konnte über die Retentionszeit der Verbindungen eine Zuordnung vorgenommen werden.

5.4.2 Methodenoptimierung mittels High Resolution-Monolithen

Nachdem die Untersuchungen der Zubereitungen fertiggestellt waren, wurde uns eine Säule der zweiten Generation von monolithischen RP-Säulen zur Verfügung gestellt (HR-Monolithen = *High Resolution*-Monolithen). Hiermit konnte auf Grund der geringeren Trennstufenhöhe der Säule, ohne die Notwendigkeit einer Kopplung, die oben dargestellte Trennung weiter optimiert werden (s. Abbildung 5.15).

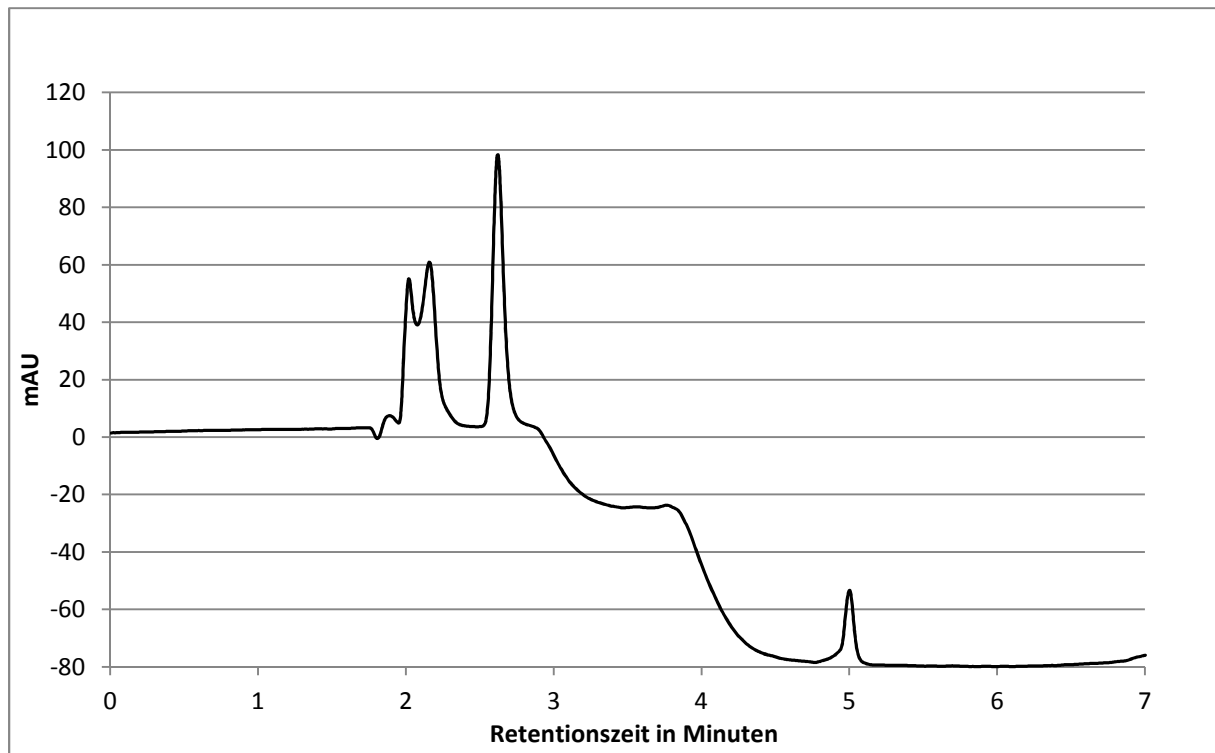


Abbildung 5.15 - Beispielchromatogramm der optimierten Trennung von Erythromycin (5,00 Minuten), Metronidazol (2,61 Minuten) und Ethanol (2,16 Minuten) mittels *High Resolution*-Monolithen.

Die Basislinientrennung von Ethanol und Metronidazol wurde durch eine Erhöhung des Pufferanteils in der mobilen Phase möglich. Um jedoch die dadurch bedingte Verzögerung der Erythromycinelution zu mindern, wurde ein Fließmittel (Elutionskraft) und Flussratengradient überlagert. Eluent A: 30 % Acetonitril + 70 % Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 7,0 0,02 mol/L; Eluent B: Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 7,0 0,02 mol/L. 0 - 2,8 Minuten 60 % A bei 0,8 mL/min ; 3,2 - 6,0 Minuten: 100 % A bei 5 mL/min ; 7,0 - 9,0 Minuten: 60 % A bei 1,2 mL/min. Siehe auch Kapitel 8.1.3.2.

Der Abfall der Basislinie nach Erhöhung der Flussrate bei 2,8 Minuten ist bedingt durch die geringere Passagezeit des pufferhaltigen Eluenten am Detektionsfenster. Mit dem Erreichen der Zielflussrate stabilisiert sich die Basislinie daher vorläufig bei etwa 3,4 Minuten, bis sie auf Grund des fallenden Phosphatanteils wieder absinkt (3,7 Minuten) um sich schließlich bei Minute 4,7 wieder zu stabilisieren. Hier hat das Eluentengemisch das Säulenvolumen einmal durchlaufen. Dieser Vorgang benötigt als Faustregel für Säulen mit einem Durchmesser von 4,6 mm, ein Volumen des neuen Eluenten entsprechend der Länge der Säule in cm, also 10 mL mit 100 mm Säulenlänge. Bei einer Flussrate von 5 mL/min ist dies erst bei Minu-

te 5,2 der Fall, weshalb der Peak leichtes Fronting zu zeigen scheint. Betrachtet man die Basislinie bei Minute 5,2 kann man jedoch erkennen, dass die Faustregel hier Gültigkeit besitzt. Das Flussratenprogramm findet in dieser Intensität, also bei so hohen Flussraten und Flussratenänderungen ($10,5 \text{ mL/min}^2$) nur für monolithische Säulen Anwendung. Die Anwendung ermöglicht eine unkomplizierte Verkürzung von langwierigen Trennungen und vereinfacht auf diese Weise die Methodenentwicklung erheblich. Partikuläre Säulen verursachen bei ähnlich hohen Flussraten zu hohen Rückdruck und würden nicht zuletzt durch die schnellen Flussratenänderungen Schaden nehmen.

Dies macht monolithische Säulen auch aus ökonomischer Sicht interessant. Schließlich verkürzen sich hierdurch Arbeitsprozesse. Der Fließmittelverbrauch ist bei unveränderlicher Anzahl an zu untersuchenden Proben identisch. Durch die Monolithen der zweiten Generation entfällt für viele Trennungen die Kopplung mehrerer Säulen. Hierdurch verkürzt sich die Analysenzeit bei gleichzeitig geringerem Säulenverschleiß. Dauertestungen des Materials werden zeigen müssen ob die Langlebigkeit auf dem Niveau der ersten Generation dieses Säulentyps liegt. Bis diese Testungen vorliegen, bleiben die HR-Monolithen eine vielversprechende Entwicklung in der RP-Chromatographie.

5.5 CE als weitere Möglichkeit

Im Rahmen dieser galenischen Untersuchung wurden in der Arbeitsgruppe Wätzig von meinem Kollegen Markus Nachbar ergänzende Analysen mittels Kapillarelektrophorese (CE), genauer der Kapillarzonenlektrophorese (CZE), durchgeführt. Auf die technischen Details dieser Technik soll an dieser Stelle jedoch nicht eingegangen werden. Zur Quantifizierung von Metronidazol und Erythromycin wurde eine Methode von Laloo et al. modifiziert [139]. Da diese Methode jedoch nur auf die Bestimmung von Erythromycin ausgelegt war, musste diese dahingehend optimiert werden, dass Metronidazol innerhalb eines Laufes mit erfasst werden kann (zur Methode s. Kapitel 8.3.1).

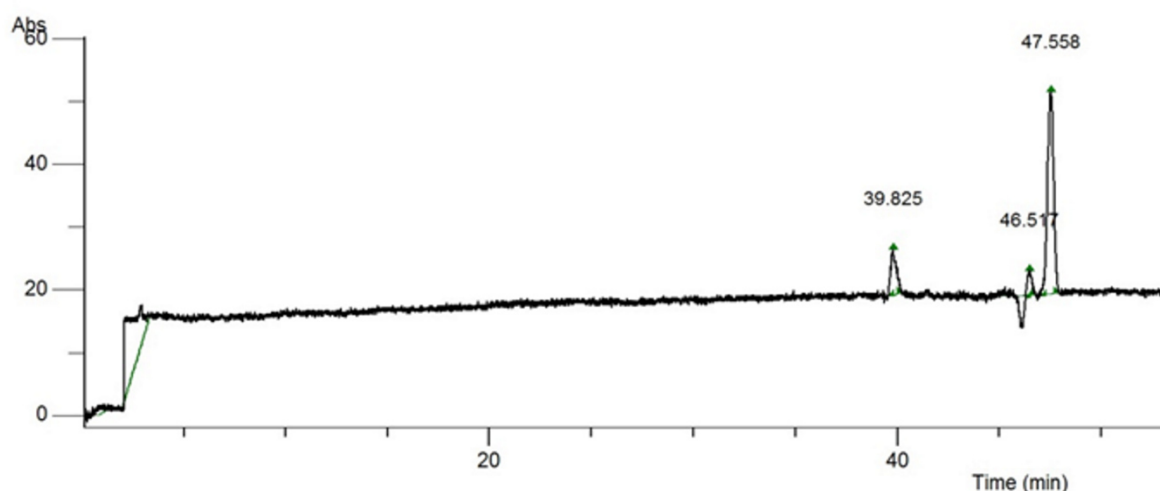


Abbildung 5.16 - repräsentatives Elektropherogramm der Trennung von Erythromycin (39,8 Minuten) und Metronidazol (47,6 Minuten). Auch zu sehen ist ein mögliches Nebenprodukt von Erythromycin (46,5 Minuten). Als Probelösungen diente eine Referenzlösung aus Erythromycin mit einer Konzentration von 1,66 mg/L und Metronidazol mit einer Konzentration von 0,84 mg/L. Die Detektion erfolgte bei 200 nm.

Wie bei kapillarelektrophoretischen Trennungen üblich, zeigen die Peaks bei dieser Methode eine hohe Symmetrie bei relativ geringem Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) (s. Abbildung 5.16). Dies ist unter anderem der kurzen Detektionsstrecke geschuldet, die hier dem Innendurchmesser der Kapillare von 75 µm entspricht. Nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz, ist die Absorption neben der Detektionsstrecke d direkt abhängig von der molaren Konzentration c und dem molaren Absorptionskoeffizienten ε :

$$A = \varepsilon * c * d$$

Formel 5.1 - Eine Darstellung des Lambert-Beer'schen Gesetzes. A = Absorption (ohne Dimension), ε molarer Absorptionskoeffizient in $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, c die molare Konzentration in mol/L und d die Schichtdicke der Probenmesszone in cm.

Wie in Abbildung 5.16 zu sehen, ist das S/N für das Erythromycinsignal trotz höherer Konzentration in der Lösung deutlich geringer ($S/N = 4$) als das für Metronidazol ($S/N = 47$). Der Grund hierfür ist der molare Absorptionskoeffizient des Erythromycins. Dieser ist auf Grund des wenig ausgeprägten Chromophors sehr gering (s. Abbildung 3.2 und Kapitel 5.4). Eine Verbesserung der Signalintensität (Absorption) und somit eine Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses kann auf unterschiedlichen Wegen erreicht werden. Für die vorliegende Methode bietet sich eine Steigerung der Stoffmengenkonzentration c in der Probenzone an. Dies ist möglich durch eine erhöhte Kapillarbeladung mittels elektrokinetischer Injektion. Hierbei werden geladene Probenmoleküle bereits vor der eigentlichen Trennung durch Anlegen einer Spannung in dem in die Kapillare injizierten Volumen angereichert. Metronidazol und Erythromycin unterscheiden sich bezüglich ihrer Säure-Baseeigenschaften. Da über die Wahl des pH-Wertes der Probenlösung die Ladung der Moleküle also gezielt beeinflusst werden kann, bietet dieses Verfahren eine vielversprechende Möglichkeit zur Erhöhung des Signal/Rausch-Verhältnisses von Erythromycin ohne die Gefahr der Überladung durch Metronidazol. Neben dieser Möglichkeit zur Steigerung der Signalintensität kann die elektrokinetische Injektion aber auch sinnvoll eingesetzt werden, um das notwendige Probenvolumen für eine Analyse zu senken. Mona Mozafari hat hierzu spezielle Untersuchungen angestellt [140]. Durch die Substanzabhängigkeit dieses Verfahrens ist jedoch keine genaue Quantifizierung der Signale mehr möglich. Ist eine quantitative Bestimmung gewünscht, kann dies über eine Erhöhung der Detektionsstrecke erreicht werden. Durch die Verwendung einer Z-Zelle oder einer *bubble-cell* erhöht sich die Schichtdicke d in Formel 5.1 und die Absorption steigt. Dies wurde während der Methodenoptimierung nicht geändert, stellt aber einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Erhöhung des S/N dar.

Auf Grund der verhältnismäßig langen Analysendauer von über 53 Minuten und dem geringen S/N von Erythromycin konnte die entwickelte CE-Methode dem hohen Probenaufkommen der galenischen Untersuchung dieses Kapitels nicht gerecht werden, weshalb auf die HPLC zurückgegriffen wurde. Jedoch bleibt die CZE trotzdem eine denkbare Alternative zur Bestimmung der beiden Wirkstoffe mittels HPLC, nicht zuletzt wegen des geringen Probenbedarfs und weitgehender Optimierungsmöglichkeiten der Methode.

5.6 Lagerung

Die Effekte der Lagerungsbedingungen auf den Wirkstoffgehalt der untersuchten Zubereitungen wurden für drei unterschiedliche Temperaturen untersucht.

1) Kühlschranklagerung 2-8 °C (KS)

2) Klimaraum 20 °C (KR)

3) Brutschrank 34 °C (Inkubator)

Hierzu wurden die Lösungen der flüssig-flüssig Extraktion aus den jeweilig gelagerten Zubereitungen filtriert und mittels HPLC vermessen (s. Kapitel 8.1.3.2). Tabelle 5.1 fasst die Wiederfindungsraten und pH-Werte der untersuchten Zubereitungen nach einem Zeitraum von 4 bzw. 8 Wochen zusammen:

Lagerdauer	Methode der Herstellung	Zubereitungsgrundlage/ Lagerungskondition	Wirkstoff	Wiederfindung [% vom Anfangsgehalt]	pH
4 Wochen	TT ¹	NRF (KS ²)	Metronidazol	94,0	8
			Erythromycin	95,2	
	MV ³	NRF (KS)	Metronidazol	92,0	8
			Erythromycin	90,9	
	TT	NRF (KR ⁴)	Metronidazol	95,0	8
			Erythromycin	91,0	
	TT	NRF WCS ⁵ (KR)	Metronidazol	92,8	9-10
			Erythromycin	94,5	
	TT	NRF (Inkubator ⁶)	Metronidazol	91,3	8
			Erythromycin	78,5	
	MV	WHSP ⁷ (KS)	Metronidazol	99,4	7,5-8
			Erythromycin	89,3	
	MV	WHSP (KR)	Metronidazol	95,8	7,5-8
			Erythromycin	80,6	

	MV	WHSS ⁸ (KR)	Metronidazol	81,9	6,5
			Erythromycin	57,3	
8 Wochen	TT	NRF (KS)	Metronidazol	94,0	8
			Erythromycin	89,7	
	MV	NRF (KS)	Metronidazol	91,6	8
			Erythromycin	83,7	
	TT	NRF (KR)	Metronidazol	94,5	8
			Erythromycin	82,1	
	TT	NRF WCS (KR)	Metronidazol	92,2	10-11
			Erythromycin	88,0	
	TT	NRF (Inkubator)	Metronidazol	86,2	8
			Erythromycin	55,2	
	MV	WHSP (KS)	Metronidazol	99,2	7,5-8
			Erythromycin	74,0	
	MV	WHSP (KR)	Metronidazol	94,5	7,5-8
			Erythromycin	67,0	
	MV	WHSS (KR)	Metronidazol	82,2	5,5-6
			Erythromycin	55,0	

Tabelle 5.1 - Wiederfindungsraten und pH-Werte der untersuchten halbfesten Zubereitung nach 4 bzw. 8 Wochen Lagerung bei verschiedenen Temperaturen. 1) TT = Herstellung mit automatischem Rührsystem bei 1500 rpm für 6 Minuten; 2) Kühlschrank (KS); 3) MV = Manuelle Verarbeitung; 4) Klimaraum bei 20 °C (KR); 5) WCS = Zubereitung nach NRF ohne die Zugabe von Zitronensäurelösung; 6) Inkubator wurde bei 34 °C betrieben; 7) WHSP = WHS konserviert mit Propylenglycol; 8) WHSS = WHS Konserviert mit Benzoesäure und Kaliumsorbat.

5.6.1 Einfluss des pH-Wertes

Die Unterschiede im pH-Wert gehen vornehmlich auf die unterschiedlichen Konservierungsmethoden bzw. Konservierungsmittel zurück. Propylenglycol ist ein pH-neutraler zwei-

wertiger Alkohol, welcher ab einer Konzentration von 20 % (m/m) in der wässrigen Phase konservierend wirkt.

Kaliumsorbat ist das gut wasserlösliche Salz der Sorbinsäure. Konservierend wirksam ist jedoch die protonierte Form, daher liegt der pH-Wert der Zubereitung idealerweise unter 6,5. Die in der NRF 11.138-Rezeptur vorgeschlagene Pufferung mit Zitronensäurelösung stellt den pH-Wert der Rezepturen auf ein neutrales bis leicht alkalisches Niveau um pH 8 ein, weshalb hier nicht mit Sorbinsäure konserviert werden sollte. Das NRF stellt den pH-Wert auf den Wert ein, bei dem Erythromycin die größte hydrolytische Stabilität zeigt [136, S. 6]. Oberhalb und unterhalb von pH 8 kann man rasch eine deutliche Abnahme des Erythromycingehaltes beobachten. Dies wurde in einer Versuchsreihe bei unterschiedlichen pH-Werten mittels HPLC überprüft. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (s. Kapitel 9.1). Nach 24 Stunden in einer wässrigen Lösung mit einem pH von 4 waren noch etwa 12 % der ursprünglich detektierten Menge vorhanden. Indes muss man sich laut Literatur weniger Sorgen um die hydrolytische Stabilität von Metronidazol machen. Hier wird eher die photolytische Instabilität und damit einhergehende Bildung von kanzerogenem Nitrit befürchtet. Die Hydrolysegeschwindigkeit von Metronidazol ist abhängig vom pH-Wert und zeigt größte Stabilität im leicht sauren Bereich (pH 4-6) [141]. Bei pH 8 ist die Hydrolysegeschwindigkeit um den Faktor 10 erhöht, jedoch trotzdem gering [136, S. 5–6]. Eigene Versuche zur hydrolytischen Stabilität bei pH 4 und 10 konnten dies bestätigen (s. Kapitel 9.1).

5.6.1.1 Metronidazol

Abbildung 5.17 und Abbildung 5.18 zeigen die mit der HPLC bestimmten Gehälter von Metronidazol in den untersuchten halbfesten Zubereitungen.

Die Lagerung im Kühlschrank zeigt für beide Grundlagen die geringste Abnahme des Metronidazolgehaltes. Überraschenderweise zeigt die Lagerung bei 20 °C im Klimaraum größere Verluste ($\Delta_c = -13,3\%$) nach 4 Wochen als die im Brutschrank gelagerte Zubereitung ($\Delta_c = -8,7\%$).

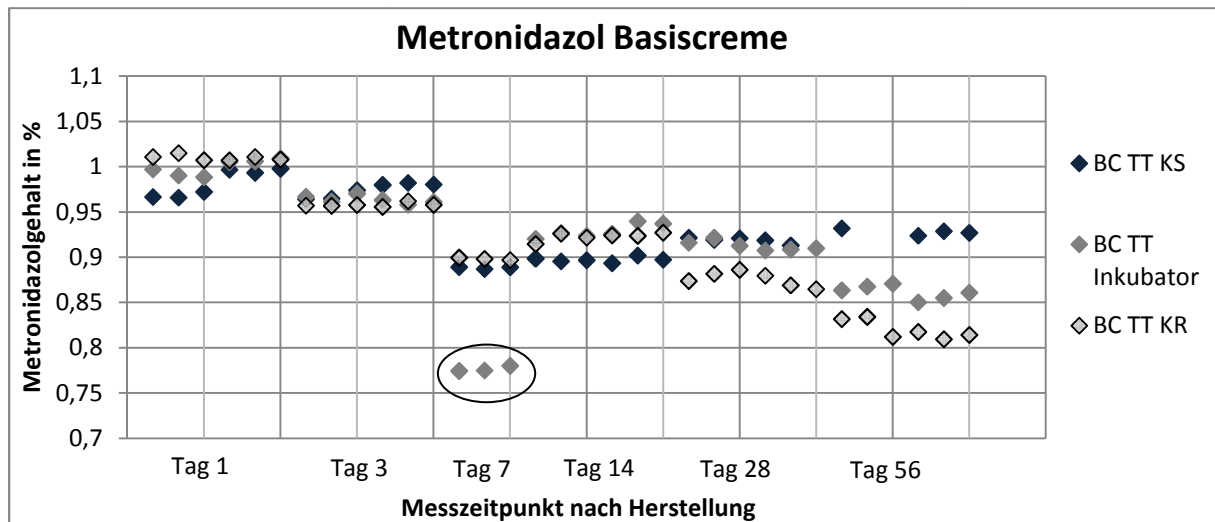


Abbildung 5.17 - Kontrollkarte zum Gehalt von Metronidazol in Basiscreme nach NRF 11.138 bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. TT = Herstellung im TopiTec® ; Inkubator = Lagerung im Brutschrank bei 34 °C ; KR = Lagerung im Klimaraum bei 20 °C ; KS = Kühltanklagerung 4 - 8 °C . Der Metronidazolgehalt ist für alle Lagerungsbedingungen über einen Zeitraum von 56 Tagen weitestgehend stabil. Bis auf Tag 7 wurden täglich zweimal drei Messungen jeder Zubereitung durchgeführt, um evtl. temperaturbedingte Tagesschwankungen zu erfassen. Fehlende Datenpunkte konnten auf Gerätefehler zurückgeführt werden und sind daher hier nicht berücksichtigt.

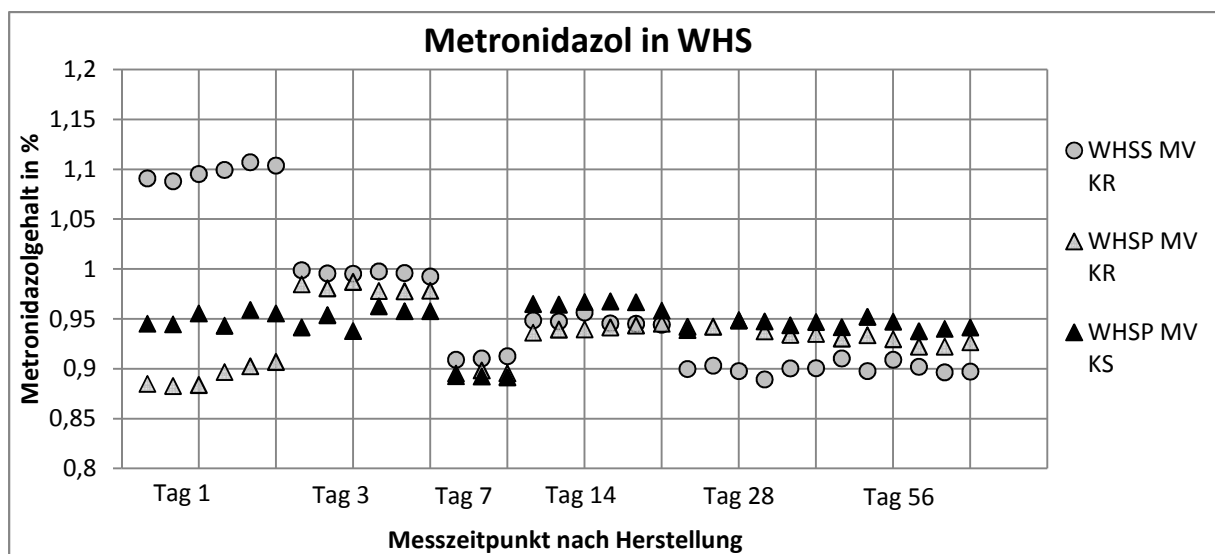
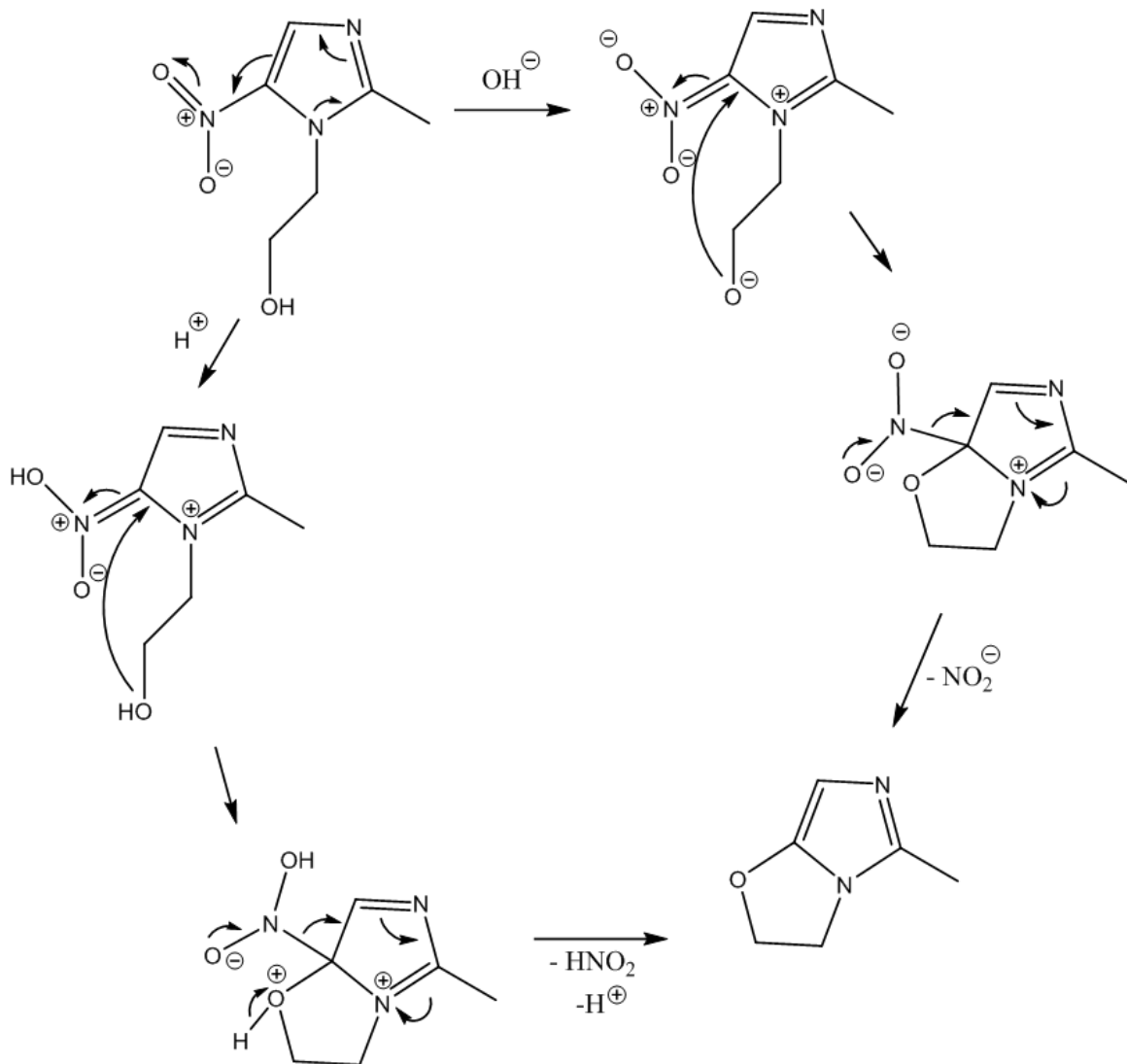


Abbildung 5.18 - Kontrollkarte zum Gehalt von Metronidazol in Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe (WHS). Der Metronidazolgehalt ist für alle Lagerungsbedingungen über einen Zeitraum von 56 Tagen weitestgehend stabil. Bis auf Tag 7 wurden täglich zweimal drei Messungen jeder Zubereitung durchgeführt um evtl. temperaturbedingte Tagesschwankungen zu erfassen.

Bemerkenswert ist die Abnahme des Metronidazolgehaltes der WHSS-Zubereitung, die mit Kaliumsorbat bzw. Sorbinsäure konserviert ist und den hier niedrigsten gemessenen pH-Wert zwischen pH 5,5 und 6,5 zeigt, welcher weitgehend dem Stabilitätsoptimum von Metronidazol entspricht (s. Tabelle 5.1). Dennoch ist ein Abbau von Metronidazol hier denkbar.

Eine mögliche Umsetzung von Metronidazol, die sowohl sauer als auch alkalisch katalysiert sein kann, wurde von Salo et al. beschrieben [142, S. 744] und ist in Formel 5.2 dargestellt.



Formel 5.2 - Hydrolyse von Metronidazol unter alkalischen (rechts) und sauren (links) Bedingungen. Hierbei fällt neben dem Abbauprodukt auch Nitrit bzw. salpetrige Säure an, welche mit sekundären Aminen die potentiell kanzerogenen Alkylnitrosamine bilden können.

Die markierten Datenpunkte in Abbildung 5.17 gehen wohl auf Fehler bei der Herstellung des Fließmittelgemisches zurück. Eine andere Ursache lässt sich durch die gute Wiederholbarkeit innerhalb der drei Injektionen fast ausschließen. Die Messungen des Gehaltes innerhalb eines Tages (6 Injektionen) zeigten relative Standardabweichungen zwischen 0,5 - 0,9 %. Einwiegefehler beim Probenzug sind auszuschließen, da kleinere Begleitpeaks durch die

Matrix ähnliche Flächen zeigen wie in den Chromatogrammen der anderen Messtage. Nicht vollends auszuschließen ist eine Inhomogenität der Wirkstoffverteilung.

Dies ist jedoch eher bei der Verarbeitung von schlechter benetzbaren Wirkstoffen zu beobachten, welche dann leicht Wirkstoffnester bilden, während andere Bereiche annähernd wirkstofffrei bleiben. Wie in Kapitel 5.2 beschrieben, kann es bei den untersuchten Zubereitungen jedoch auch zu einer Reifung von Kristallen kommen. Läuft dieser Prozess im Sinne einer Ostwald-Reifung ab, ist auch hier die Entstehung wirkstoffverarmter Bereiche möglich. Auf Grund der Größe des Probenzuges von 2,0 g pro Messtag ist es jedoch statistisch unwahrscheinlich einen so großen wirkstoffarmen Raum abzutragen.

5.6.1.2 Erythromycin

Wie bei Metronidazol erfolgt auch hier der größte Wirkstoffverlust in der sauer konservierten WHSS. Der relative Verlust an Wirkstoff ist bei Erythromycin ausgeprägter als bei Metronidazol, was zu erwarten war und auch gezeigt werden konnte (s. Kapitel 9.1). Abbildung 5.19 zeigt den Gehalt von Erythromycin in den verwendeten Grundlagen über einen Zeitraum von 56 Tagen. Neben den hohen Einbußen in WHSS ($\Delta_c = -45,1 \%$), ist die hohe Stabilität der Zubereitung nach NRF zu bemerken ($\Delta_c = -10,3 \%$ nach 56 Tagen). Dieser Unterschied ist dem leicht erniedrigten pH-Wert, aber auch dem höheren Wasseranteil der WHSS-Grundlage zuzuschreiben (70 % (m/m) gegenüber 59 % (m/m)) in NRF). Hierdurch befindet sich ein größerer Anteil des Wirkstoffes in gelöster Form und ist so Hydrolyseprozessen ausgesetzt. Je niedriger der pH einer Grundlage ist, desto stärker fällt dieser Effekt aus, da ein zunehmender Anteil des Erythromycins geladen und daher besser wasserlöslich vorliegt.

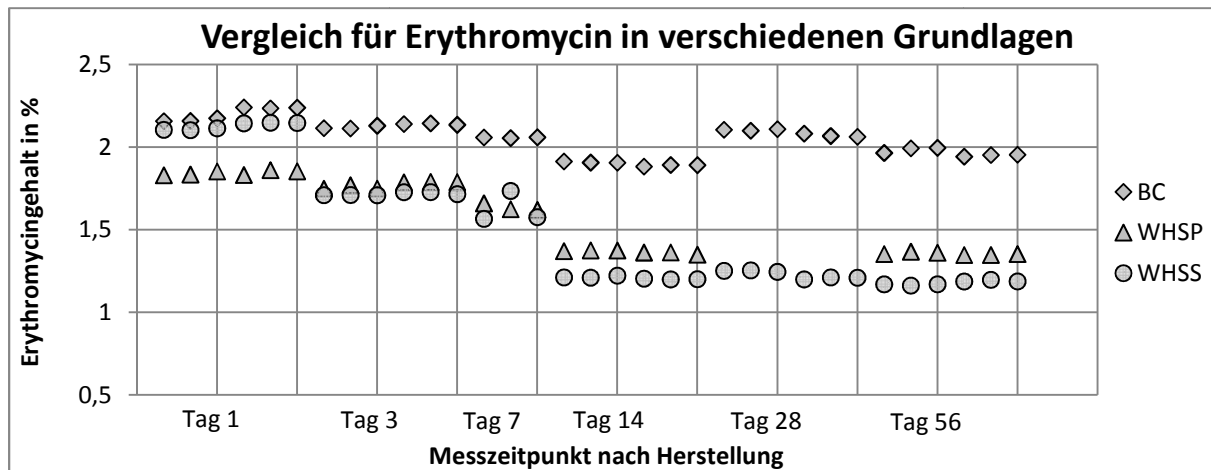


Abbildung 5.19 - Kontrollkarte über den Gehalt an Erythromycin in den drei verwendeten Grundlagen bei Lagerung im Klimaraum (20 °C). Der Erythromycingehalt zeigt für die Zubereitung nach NRF 11.138 in BC die größte Stabilität. Die größte Abnahme im Gehalt wird bei der sauer konservierten WHSS beobachtet. Bis auf Tag 7 wurden täglich zweimal drei Messungen jeder Zubereitung durchgeführt um evtl. temperaturbedingte Tagesschwankungen zu erfassen. Fehlende Datenpunkte konnten auf Gerätefehler zurückgeführt werden und sind daher hier nicht berücksichtigt.

Der Gehalt an Erythromycin in den halbfesten Zubereitungen, die auf BC basieren, ist daher stabiler als in solchen die auf WHS basieren. In der Zubereitung nach NRF wird zusätzlich mit Pufferlösung gearbeitet. Um den Effekt der Pufferlösung zu zeigen, wurde eine NRF-Rezeptur ohne diese Lösung hergestellt. Auf Grund des alkalisch reagierenden Erythromycins zeigte die halbfeste Zubereitung einen pH von 9-11. Trotzdem zeigte sich eine außerordentlich hohe Stabilität der Wirkstoffgehalte in der ungepufferten WCS ($\Delta_{cEry} = -12,0 \%$). Auch in den Versuchen zur Stabilität von Erythromycin in wässriger Lösung zeigte sich bei pH 12, verglichen mit dem bei pH 4 gelösten Wirkstoff eine verhältnismäßig hohe Stabilität (s. Kapitel 9.1).

Diese Beobachtung lässt in Verbindung mit dem erniedrigten Anteil an Erythromycin in der wässrigen Phase bei dem in WCS gemessenen pH-Wert eine Erklärung für die überraschend hohe Stabilität des Wirkstoffes zu.

Aus Abbildung 5.20 lässt sich entnehmen, dass eine Lagerung bei erniedrigten Temperaturen sich günstig auf die Wirkstoffstabilität auswirkt. Nach einem Zeitraum von 28 Tagen, welcher auch einen herkömmlichen Zeitraum für die Verwendbarkeit einer halbfesten Zubereitung abdeckt, ist jedoch der Unterschied zwischen Kühlschrank und Klimaraum-Lagerung marginal.

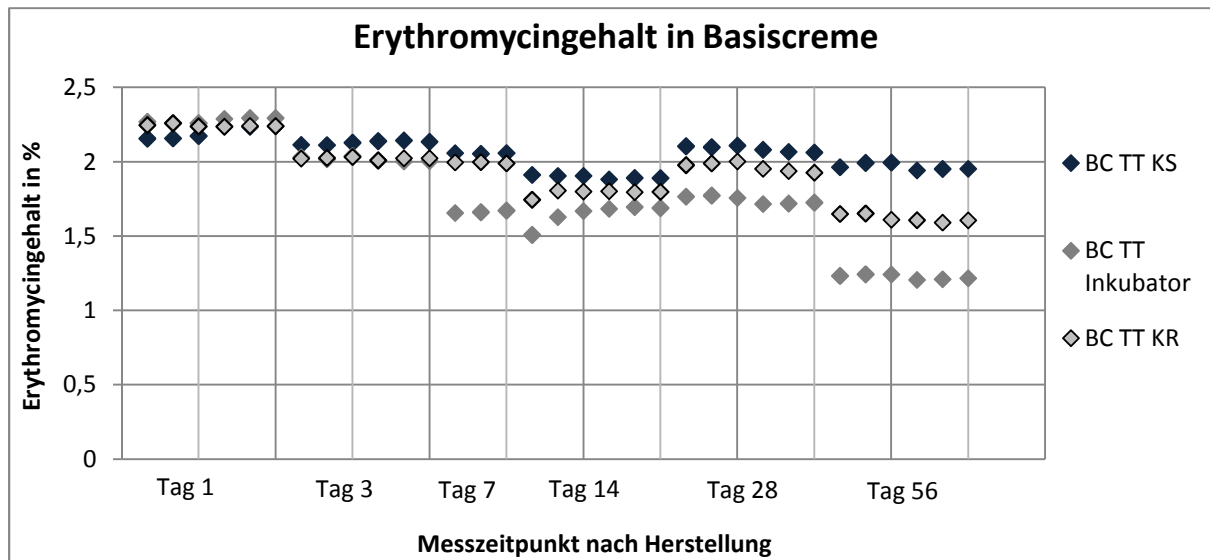


Abbildung 5.20 - Kontrollkarte über den Erythromygingehalt in Basiscreme bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen. TT = Herstellung im TopiTec®; Inkubator = Lagerung im Brutschrank bei 34 °C ; KR = Lagerung im Klimaraum bei 20 °C ; KS = Kühlschranklagerung 4 - 8 °C. Der Erythromygingehalt ist für alle Lagerungsbedingungen über einen Zeitraum von 28 Tagen weitestgehend stabil. Bis auf Tag 7 wurden täglich zweimal drei Messungen jeder Zubereitung durchgeführt um evtl. temperaturbedingte Tagesschwankungen zu erfassen.

Bei den Messungen mittels HPLC ist zu bemerken, dass bei Untersuchungen nach einer flüssig-flüssig Extraktion kristalline Anteile der Wirkstoffe angelöst und so miterfasst werden. Diese kristallinen Anteile sind jedoch für die therapeutische Wirkung von untergeordneter Relevanz, da nur gelöste Wirkstoffe einen therapeutischen Effekt ausüben können. Man muss hier also von einem absoluten Gehalt der Wirkstoffe in der Zubereitung sprechen. Durch ein starkes Kristallwachstum sinkt dieser zwar nicht ab, jedoch steht trotzdem weniger therapeutisch aktiver Wirkstoff zur Verfügung, weswegen man dann von einem "effektiven" Wirkstoffgehalt sprechen sollte. Dieser lässt sich nicht ohne Weiteres bestimmen. Hierzu müssten gezielt kristalline Anteile aus der Grundlage entfernt und quantifiziert werden. Nach meinem aktuellen Kenntnisstand gibt es keine praktikable Methode um dies bei dem anfallenden Probenaufkommen durchzuführen.

Das Kristallwachstum sollte daher möglichst von Beginn der Herstellung an unterbunden werden um eine durch Ostwald-Reifung verursachte Bildung großer Kristalle zu vermeiden. Hierdurch würde ein (therapeutisch) effektiver Mindergehalt, aber auch eine mechanische Reizung bei der Anwendung der Zubereitung vermieden, welche vor allem auf erkrankten Hautarealen problematisch und compliancegefährdend ist.

5.7 Photolabilität von Metronidazol

Die photolytische Stabilität von Metronidazol wurde bereits in Kapitel 5.6 erwähnt. Im Kommentar zur Arzneibuchmonographie wird beschrieben, dass in wässriger Lösung das Oxadiazolderivat von Metronidazol nachgewiesen werden kann. Die Entstehung wird als photolytisch dargestellt (s. Abbildung 5.21).

Tong et al. konnten neben diesem bekannten Photolyseprodukt noch zwei weitere finden (TP142 und TP127) und die tautomere Verbindung TP142 strukturell darstellen [143, S. 426–427].

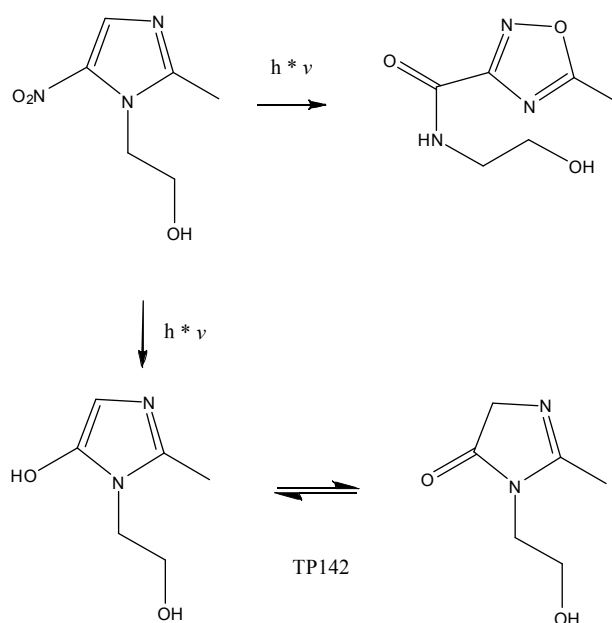


Abbildung 5.21 - Photolyseprodukte des Metronidazols nach Tong et al. und Ph.Eur.

Um die Relevanz der Photolabilität zu prüfen, wurde eine wässrige Metronidazol-Lösung gefertigt und Aliquote davon über 5 Stunden bei 254 nm, für 5 Tage bei Tageslicht und dunkel gelagert. Abbildung 5.22 zeigt drei Chromatogramme dieser Untersuchung. Die vor Licht geschützt gelagerte Lösung zeigt geringe Vorpeaks. Das chromatographische Profil dieser Probe unterscheidet sich nur wenig von der mittels UV-Lampe bei 254 nm gestressten Probe. Die Sonnenlichtexponierung zeigt nach 5 Tagen jedoch einen deutlichen Effekt. Nahezu kein intaktes Metronidazol ist mehr vorhanden. Die beiden vorgelagerten Signale bei 0,83 und 0,95 Minuten haben deutlich zugenommen, was auf die Entstehung von mindestens zwei Abbauprodukten schließen lässt, die eine höhere Polarität als Metronidazol aufweisen.

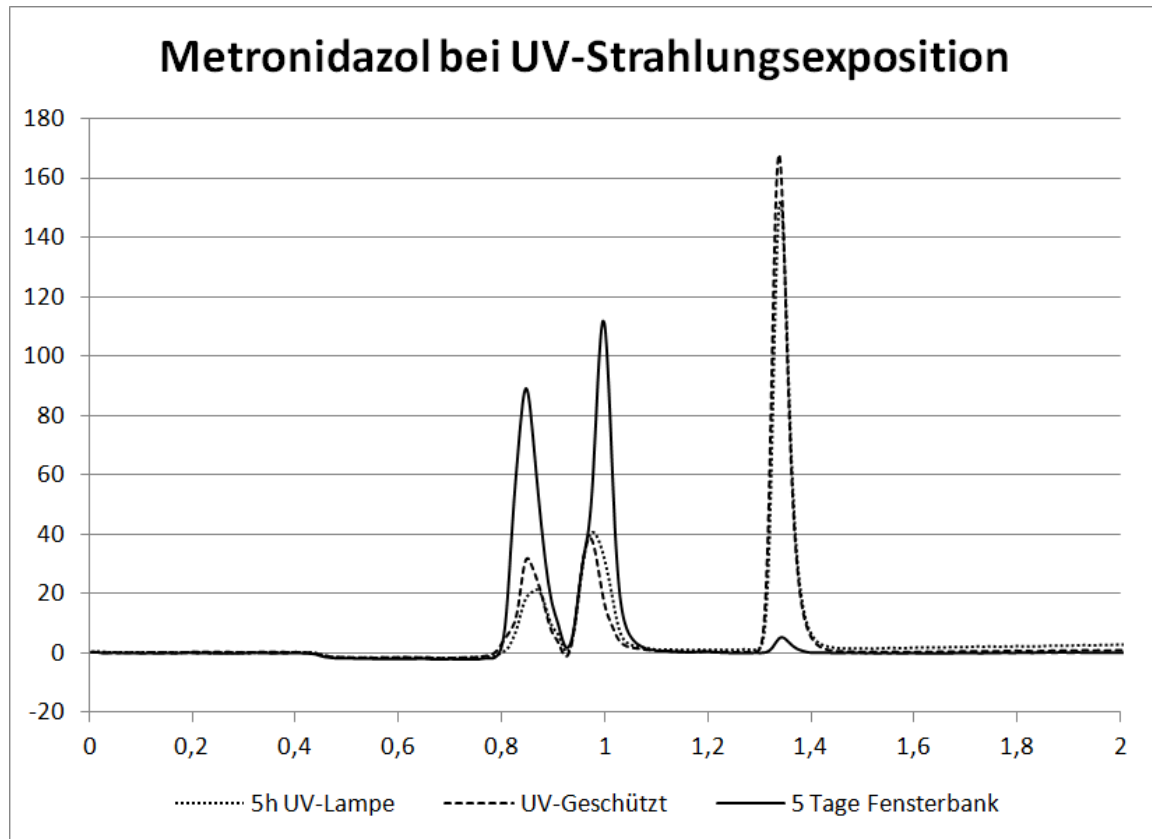


Abbildung 5.22 - Überlagerung von drei Chromatogrammen. Die durchgehende Linie zeigt eine Metronidazolprobe nach 5 Tagen der Lichtexposition auf der Fensterbank. Die gestrichelte Linie zeigt das Chromatogramm einer Lichtgeschützten Probe nach 5 Tagen Lagerung. Die gepunktete Linie zeigt das Chromatogramm einer Probe nach 5 Stunden Bestrahlung bei 254 nm.

Abbildung 5.23 zeigt die DAD-Spektren von der Probe nach 5 Tagen bei Sonnenlicht und die der vor Licht geschützten Probe. Es lässt sich im Vergleich hier gut erkennen, dass sich unter dem Signal bei 1,0 Minuten bei der exponierten Probe eine zusätzliche Komponente ausgebildet hat, welche etwas später eluiert als der ursprüngliche Peak. Dadurch erklärt sich die Verlagerung der Retentionszeit und das leichte Linksschultern dieses Signals in der exponierten Probe. Auf diese Weise konnten mittels chromatographischer Daten drei mögliche Photolyseprodukte festgestellt werden.

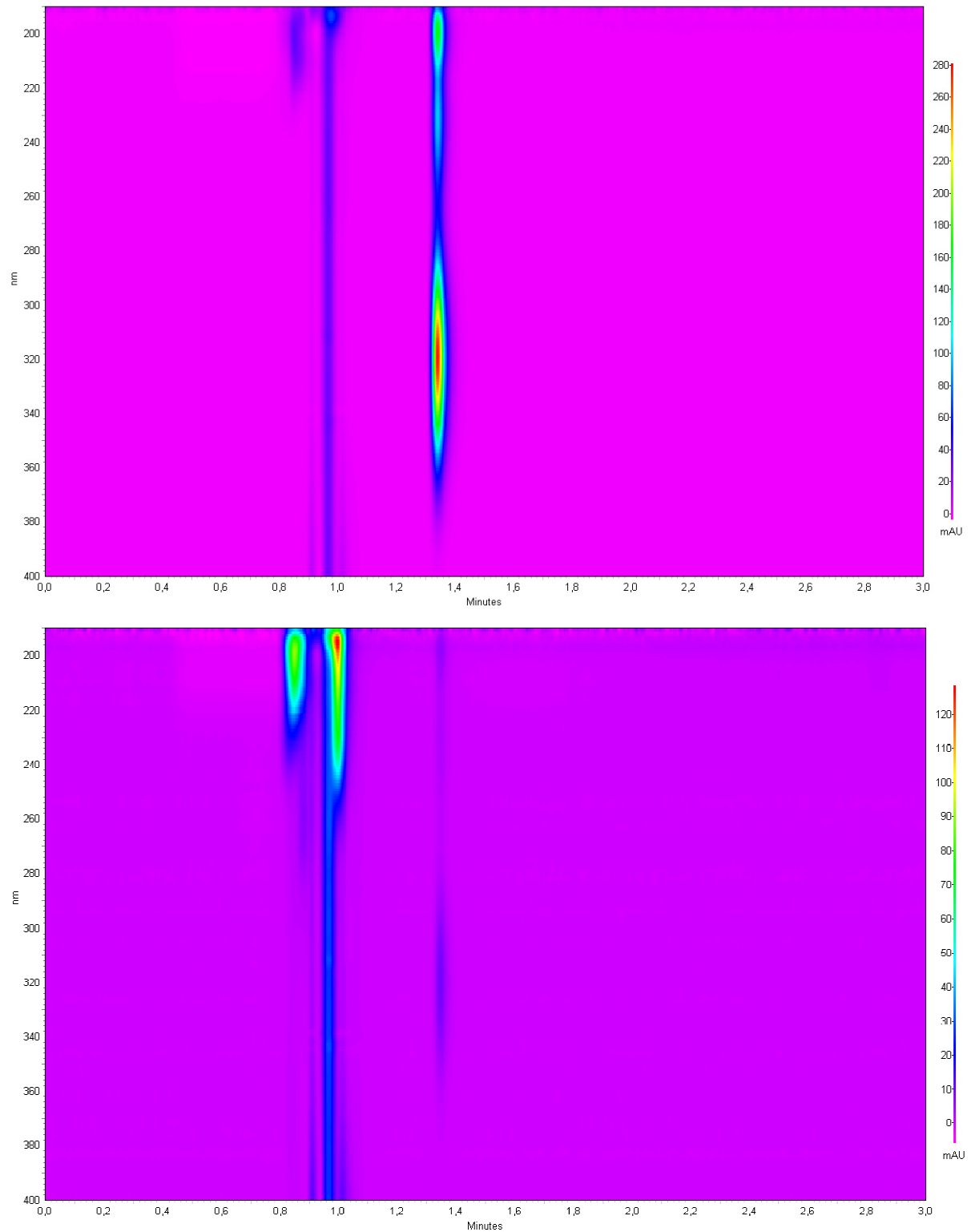


Abbildung 5.23 - DAD-Spektren einer vor Licht geschützten Metronidazolprobe (oben) und einer Probe die für 5 Tage auf der Fensterbank gelagert wurde (unten). Neben dem Verlust an intaktem Metronidazol bei etwa 1,38 Minuten, gut zu erkennen an den drei Absorptionsmaxima, erkennt man das Erscheinen einer zusätzlichen Komponente bei etwa 1,0 Minuten bei der exponierten Probe.

6 HR-CS-AAS

6.1 Prinzip der AAS

Die Atomabsorptionsspektrometrie ist eine Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Elementen. Anders als bei der UV-Spektrometrie stellen keine Moleküle, sondern einzelne, isoliert voneinander vorliegende Atome die Messobjekte dar. Diese Atome liegen während der Messung in der Gasphase vor und unterliegen keiner Wechselwirkung durch Bindungspartner. Die Elektronen in der Atomhülle befinden sich in bestimmten Aufenthaltsräumen, den Orbitalen. Die Elektronen sind dazu in der Lage, Energie aufzunehmen, wodurch sie in ein anderes Orbital bzw. Energieniveau angehoben werden können. Hierzu muss diese Energie jedoch genau der Energiedifferenz zwischen dem ursprünglichen Orbital (Grundzustand) und dem neuen, angeregten Zustand entsprechen, da ein Aufenthalt außerhalb eines Orbitals nicht möglich ist. Man spricht daher auch von Resonanz. Der auf solche Weise erzwungene Aufenthalt des Elektrons in einem angeregten Zustand ist in der Regel von kurzer Dauer (10^{-7} bis 10^{-9} Sekunden). Nach dieser Zeit fällt das Elektron unter Abgabe der zuvor aufgenommenen Energie wieder zurück auf das Grundniveau. Bei diesen Übergängen kommt es in Abhängigkeit des energetischen Niveaus des Grund- und des Anregungszustands zur Absorption bzw. Emission elektromagnetischer Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge (Formel 6.1).

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Formel 6.1 - Zusammenhang zwischen den besetzbaren Energieniveaus in der Atomhülle ausgehend vom Grundzustand des Valenzelektrons E_1 in einen angeregten Zustand E_2 . Je größer ΔE ist, desto kurzwelliger wird die absorbierte bzw. emittierte Strahlung.

Die Energie der Zustände und damit der Wellenlänge der sogenannten Resonanzlinien (Spektrallinien) wird neben der Kernladungszahl des Elements auch von den Quantenzahlen des Orbitals bestimmt (Haupt-, Neben-, Magnet- und Spinquantenzahl). Die Zahl der analytisch primär relevanten Resonanzlinien wird dadurch begrenzt, dass nur diejenigen Übergänge durch Absorption angeregt werden können, welche vom Grundzustand eines Elektrons ausgehen. Außerdem lassen in der Regel nur die Valenzelektronen Übergänge im sichtbaren bis ultravioletten Bereich zu. Je mehr Valenzelektronen ein Atom besitzt, desto vielfältiger sind die (nutzbaren) Spektrallinien dieses Elements. Es gibt jedoch Ausnahmen.

Nichtmetalle wie Halogene zeigen trotz ihrer sieben Valenzelektronen keine analytisch verwertbaren Resonanzlinien. Diese liegen bei allen Nichtmetallen im Vakuum-UV-Bereich unterhalb von 200 nm [144]. Erst durch die Entwicklung von Atomspektrometern mit kontinuierlichen Strahlungsquellen in Kombination mit hochauflösenden Monochromatoren (*High Resolution Continuum Source AAS*, HR-CS-AAS) wurde in der jüngeren Vergangenheit zunehmend die Molekülatomabsorptionsspektrometrie (MAS) vorangetrieben. Bei dieser Technik werden gasförmige, meist zweiatomige Moleküle, welche z.B. Halogene enthalten, auf moleküleigenen Wellenlängenbändern gemessen. Diese Messungen können im UV-Bereich durchgeführt werden. Die meisten natürlich vorkommenden Metalle können jedoch mittels AAS bestimmt werden.

Bei der Messung wird der Intensitätsverlust der Strahlung einer (i.d.R.) analytspezifischen Strahlungsquelle nach Durchlaufen einer definierten Probenzone analysiert. Dabei gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz (Formel 5.1). Je höher die Zahl der Atome in der Gasphase im Grundzustand ist und umso länger die von der Strahlung durchlaufene probengefüllte Zone ist, desto höhere Signale werden detektiert und desto besser wird das Signal/Rausch-Verhältnis ausfallen, wodurch wiederum Nachweis- und Bestimmungsgrenze verbessert werden.

6.2 Atomisierungstechniken

Um das Zielement in die Gasphase zu überführen, in der die Messung der Absorption stattfindet, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Allen gemein ist die Fähigkeit große Hitze zu entwickeln, welche dazu dient:

- 1) die Probe zu trocknen bzw. Lösemittel zu entfernen
- 2) die Probenmatrix zu pyrolysieren
- 3) den Analyten in Form isolierter Atome in die Gasphase zu überführen

Schritt 3 wird allgemein als Atomisierung bezeichnet, da durch diesen Schritt die Atome des Zielementes isoliert voneinander im Grundzustand vorliegen.

6.2.1 Flammentechnik

Die wohl am häufigsten angewandte Methode zur Atomisierung ist die Flammen-AAS, bei der eine Flamme mit definierter Brenngaszusammensetzung verwendet wird. Die Brenner-

köpfe hierfür sind schlitzförmig gestaltet und werden in den meisten Fällen so ausgerichtet, dass das Licht der Strahlenquelle die Brennerflamme auf voller Länge durchläuft, um den d-Term aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz möglichst groß werden zu lassen. Weiter versucht man ein Brenngas/Oxidansgas-Gemisch zu wählen, welches zwar ausreichende Temperatur für die Überführung des Zielements in die Gasphase erlaubt, jedoch möglichst langsam brennt, wodurch sich die Probenbestandteile, die vom Oxidansgas fein zerstäubt und in die Brennerflamme getrieben werden, möglichst lange im Absorptionsvolumen aufhalten können. Die Wahl der Brennerflamme will wohl überlegt sein, denn ein Wechsel auf ein anderes Brenngas/Oxidansgas-Gemisch erfordert neben einer zusätzlichen Druckgasversorgung und dem Wechsel des Brennerkopfes am Gerät auch das Validieren der damit neuen Methode. Ein zentraler Punkt bei dieser Überlegung ist die Flammentemperatur, da man an diese nach der Auswahl des Gemisches gebunden ist. Relativ niedrige Temperaturen bis 2000 °C erlauben überwiegend die Bestimmung von leicht verdampfbaren Alkali- und Erdalkalimetallen. Zu hohe Temperaturen von über 3000 °C erlauben zwar die Bestimmung refraktärer Elemente, jedoch führen diese zu einer verstärkten Ionisierung von Atomen mit geringerer Austritts- bzw. Ionisierungsenergie, wodurch effektiv Probe verloren geht und die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sinken.

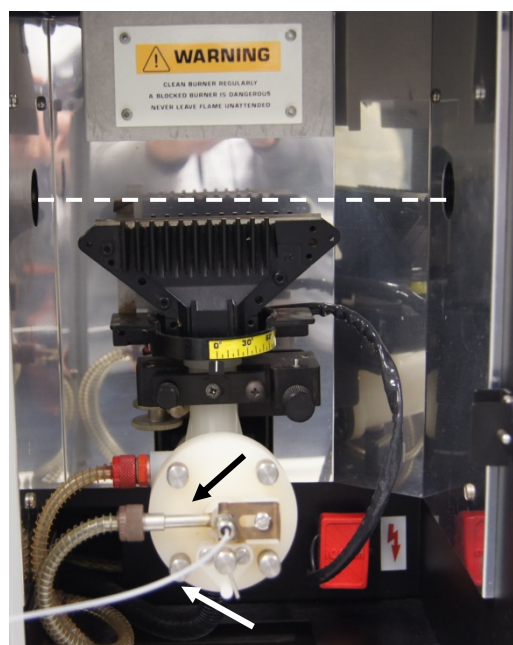


Abbildung 6.1 - Flammenatomisator einer PYE Unicam SP9 von Philips. Die gestrichelte weiße Linie zeigt den Strahlengang zwischen Lampe und Detektor an. Dieser verläuft im Bild über die volle Länge des schlitzförmigen Brennerkopfes. Die Skala zeigt die Verstellbarkeit des Brennerwinkels an. Der weiße Pfeil zeigt auf den PTFE-Schlauch zur Probenzufuhr. Das Ende des Schlauches taucht in die Probenlösung ein und wird beim Eintreten in die Zerstäuberchamber durch den zusätzlichen Oxidansgasstrom (schwarzer Pfeil) fein zerstäubt. Das Aerosol tritt direkt von unten in die Brennerflamme ein.

6.2.2 Graphitrohrfentechnik und Temperaturprogramm

Eine ebenfalls häufig verwendete, flexiblere Alternative zum Flammenatomisator ist die des Graphitrohrfens (*Graphite Furnace-AAS*, GF-AAS). Hierbei handelt es sich um eine elektrothermale Atomisierungseinrichtung, bei der ein Graphitrohr durch eine computergesteuerte Widerstandsheizung auf die gewünschte Temperatur aufgeheizt werden kann. Es ist hiermit also möglich, fast jede beliebige Temperatur in einer Schrittweite von 1 °C anzusteuern. Maximal noch sinnvoll verwendbare Temperaturen liegen bei 3000 °C. Jedoch verkürzt sich die Lebensdauer des Atomisators durch Arbeiten in diesem Temperaturbereich erheblich, wodurch die Kosten der Methode steigen.

Bei dieser Technik ist man innerhalb eines AAS-Gerätes auf eine bestimmte Rohrdimension für das Graphitrohr festgelegt. Laut dem Lambert-Beer'schen Gesetz (s. Formel 5.1) führt ein möglichst langes, dünnes Rohr über eine Verringerung des Volumens in der Probenzone zu einer Erhöhung des Terms für die Konzentration und zu einer Erhöhung des d-Terms über die verlängerte Messstrecke. Hierdurch steigt die Absorption und bessere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden erreicht. Jedoch ist die Rohrlänge durch den zur schlagartigen Erhitzung (1500 °C/s) des Rohres notwendigen Stromfluss begrenzt. Außerdem muss der Durchmesser groß genug sein, um ausreichend hohe Probenvolumina aufzunehmen. Die Probe wird durch einen Probengeber, der aus einem geführten Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schlauch besteht, in die mittig angebrachte Öffnung des Rohres injiziert (s. Abbildung 6.2). Die Dosierung läuft über eine Hamilton-Spritze. Das Dosiervolumen beträgt üblicherweise 5 - 100 µL.

Die Rohrdimensionen des in dieser Arbeit verwendeten Rohres betragen 19 mm x 6 mm, entsprechend einem absoluten Volumen von etwa 537 µL.

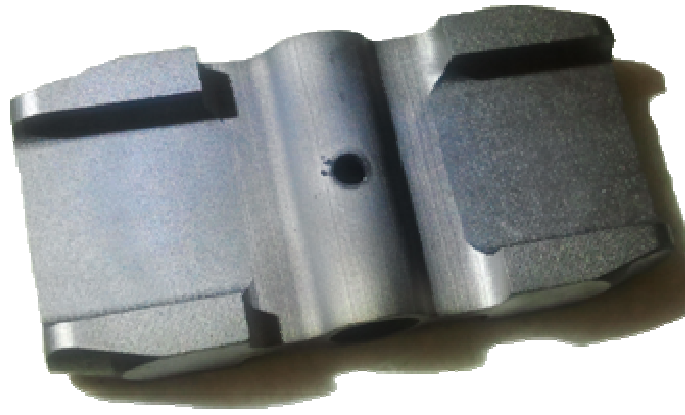


Abbildung 6.2 - Graphitrohratomisator der Firma Analytik Jena. Dieses Rohr zählt zu den Flügelrohren, die senkrecht zum Rohrverlauf beheizt werden (querbeheiztes Graphitrohr). Die Elektroden des Ofens umschließen dabei die Flügel des Rohres.

Ein zentraler Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit zur Erstellung eines Temperaturprogramms. Dieses gliedert sich grundlegend in 4 Schritte:

- 1) Trocknung des Lösemittels der Probe
- 2) Pyrolyse von Matrixbestandteilen
- 3) Überführung des Zielementes in die Gasphase
- 4) Ausheizen bei hoher Temperatur, um refraktäre Verbindungen zu entfernen und *carry-over* Effekte zu vermeiden.

Dieses Temperatur- oder auch Ofenprogramm erlaubt die Verwendung von effektiv deutlich größeren Probenvolumina als oben für die Flammenatomisatoren beschrieben. Werden nach einer Injektion nur die ersten beiden Schritte des Ofenprogramms durchgeführt und danach erneut dieselbe Probe injiziert, so kann das zu analysierende Element stark im Graphitrohr angereichert werden, bevor es in Schritt 3 vermessen wird.

Die Schritte 1 bis 3 laufen in einem Flammenatomisator zeitgleich ab. Daraus ergibt sich bei der GF-Technik eine vergleichsweise längere Analysendauer (geringerer Probendurchsatz). Das schrittweise Ablaufen der Vorgänge 1 bis 3 hat jedoch zum Vorteil, dass matrixbedingte Störungen (z.B. Rauchbildung, Streuung des Lichtes an Partikeln) in vielen Fällen vollständig beseitigt werden können, bevor es dann zu einer simultanen und schlagartigen Atomisierung des Zielementes kommt. Schritt 4 passiert in einem Flammenatomisator durch den Strom des Brenngas/Oxidansgas-Gemisches auf mechanischem Wege.

Durch das Temperaturprogramm und die injektorbasierte Probenaufgabe ist es mit der GF-Technik möglich, auch nicht rein flüssige Proben wie Suspensionen zu vermessen. So würde

das Vermessen einer Suspension bei der Flammentechnik zur Verkrustung des Brennerkopfes führen und obendrein ein hohes Untergrundrauschen aufweisen, da Licht an den Suspensionspartikeln und an deren Pyrolyseprodukten gestreut würde. Problematisch bei der Vermessung von Suspensionen ist jedoch die Neigung der Probe zur Sedimentierung. Die Stehzeit der Probe im Autosampler kann hierüber zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, was die Analyse von z.B. Zellsuspensionen und aggregierten Proteinen problematisch gestaltet.

Da der GF-Atomisator aus der Kohlenstoffmodifikation Graphit besteht, muss dieser bei den verwendeten, hohen Temperaturen vor Oxidation geschützt werden. Dies geschieht durch einen Inertgasstrom aus hochreinem Argon (99,996 % (V/V) = 4.6), welcher das Rohr von außen kontinuierlich umflutet. Auch das Rohrinne wird in den Schritten 1, 2 und 4 des Temperaturprogramms von Argon durchströmt, um das Graphitmaterial zu schützen. Außerdem wird hierdurch eine Entfernung der bei der Pyrolyse und der Trocknung anfallenden Gase aus dem Atomisator gewährleistet.

6.3 Das optische System

Das optische System eines Atomabsorptionsspektrometers besteht generell aus drei Bauteilen:

- 1) Strahlenquelle
- 2) Monochromator
- 3) Detektor

Zurzeit sind sowohl Geräte mit elementspezifischen Strahlungsquellen (Hohlkathodenlampen, Elektrodenlose Entladungslampen), als auch welche mit Kontinuumstrahlern (Xenonkurzbogenlampen (XBL)) kommerziell erhältlich. Da Atome nur Licht der Wellenlänge absorbieren können, welche sie auch emittieren, verwendet man zum Bau von elementspezifischen Strahlungsquellen das Element, das bestimmt werden soll. So werden in Hohlkathodenlampen zylinderförmige Kathoden aus dem zu bestimmenden Element geformt. Mit solchen Lampentypen lässt sich jedoch auch nur das Element bestimmen, das verbaut wurde. Der Monochromator hat bei Verwendung dieser Strahlungsquelle die Aufgabe, nur eine Resonanzlinie, auf der die Absorption gemessen werden soll, zu selektieren und auf den Detektor zu lenken. Hierdurch wird also Störstrahlung herausgefiltert und das Rauschen bei der

Messung verringert. Der Detektor ist eine einfache Photozelle bzw. *Photomultiplier*, durch den es nicht möglich ist, Licht unterschiedlicher Wellenlänge voneinander zu unterscheiden. Wie bereits weiter oben angesprochen, verlangt die Verwendung eines Kontinuumstrahlers ein aufwendiges Monochromatorensystem, um aus dem kontinuierlichen Emissionsspektrum eine Resonanzlinie des Zielements in ausreichend schmaler spektraler Bandbreite zu separieren. Atome absorbieren (und emittieren) in Abhängigkeit der vorliegenden Temperatur Licht mit der spektralen Bandbreite von etwa 3 - 7 pm auf einer Resonanzlinie. Um nun ein möglichst rauscharmes und selektives Signal zu erhalten, muss das Monochromatorensystem dazu in der Lage sein, Licht dieser spektralen Breite zu selektieren. Die sogenannten *High Resolution Continuum Source* Atomabsorptionsspektrometer (HR-CS-AAS) leisten eine spektrale Bandbreite von etwa 2 pm [144]. Ein Spektrometer dieser Bauart wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, die Eisenmenge aus myoglobinhaltigem HPLC-Eluat zu untersuchen.

6.4 Untersuchung des Einflusses der Probenvorbereitung in der Größenausschlusschromatographie mittels HR-CS-AAS und UV-VIS

Während der Vorbereitung einer (proteinhaltigen) Probe zur Analyse mittels HPLC kommt diese mit diversen Oberflächen in Kontakt. Dazu zählen Glas (z.B. Laborgeräte, Probenvials) in unterschiedlichen Qualitäten, Kunststoffe wie Polycarbonat (Hülsen von Spritzenfiltern), Polypropylen (Mikroreaktionsgefäße, Vialdeckel), Polytetrafluorethylen (PTFE) (Leitungen/Tubings) und Perfluoralkoxypolymere (Gefäße zur Probenahme), um nur einige zu nennen, aber auch modifizierte Cellulosen, die als Filtermaterial verwendet werden und rostfreier (säurebeständiger) Stahl (*Stainless Steel*). Die Wirkung von Oberflächen auf Proteine ist zwar bereits seit langem [145–149] und daher mittlerweile wohl untersucht [150], jedoch noch immer Gegenstand aktueller Forschung [151–153], was die Relevanz, aber auch die Komplexität dieser Fragestellung aufzeigt. Die Adsorption hängt von vielerlei Faktoren ab. Dazu zählen unter anderem pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke der Lösung, aber auch mögliche Zusätze wie Tenside. Die Eigenschaften der Oberfläche wie Struktur, Größe, Chemie bzw. Ladung und Hydrophobizität spielen ebenso eine Rolle wie proteinogene Eigenschaften. Neben der Größe und der Hydrophobizität des Proteins sind auch der isoelektrische Punkt und die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur sowie die Konzentration des Proteins von Relevanz.

Nakanishi zeigt, dass mit einer Erhöhung der Konzentration des Proteins in der Lösung auch die adsorbierte Menge steigt. Er unterscheidet zwei Arten von Proteinen, weiche und harte. Weiche Proteine (mit geringer struktureller Stabilität) adsorbieren ungeachtet der Oberflächenchemie und weitgehend unabhängig von elektrostatischen Kräften an vielen Oberflächen, indem sie sich formlich anpassen, während harte (strukturell stabile) Proteine mit entgegengesetzt geladenen Oberflächenstrukturen interagieren ohne hierbei ihre Form zu ändern [149]. Er macht damit einen Versuch, die Adsorptionsneigung von Proteinen zu verallgemeinern, um eine gewisse Vorhersage treffen zu können.

Kim untersuchte die Adsorption von β -Lactoglobulin an *Stainless Steel* (rostfreier Stahl) Partikeln. Es fiel dabei auf, dass die Adsorption innerhalb von 5 Minuten stark anstieg, bevor nach 10 Minuten ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption erreicht wurde. Weiterhin konnte mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen die teils irreversible Bindung einer Monolayerschicht des Proteins an die Stahlpartikel gezeigt werden [148].

Fukuzaki zeigte am Beispiel von BSA an *Stainless Steel*, dass die adsorbierte Menge an Protein mit zunehmender Ionenstärke, steigender Temperatur der Lösung und in der Nähe des IEP des Proteins zunimmt. Ein genauer Blick auf die Kurven, die er in seiner Arbeit zeigt, verrät, dass primär bei pH-Werten zwischen pH 3,5 und pH 5, mit einem Maximum von pH 4 bis pH 4,5, am meisten BSA adsorbiert wird [147]. Dieser pH-Wert liegt im Bereich des Nullpunktes der Oberflächenladung (engl.: *Zero Point of Charge*) von *Stainless Steel* (ZPC = pH 4,3) [154]. Im weiteren Verlauf soll der Begriff ZPC für den pH-Wert stehen, bei dem Oberflächen formal ungeladen sind. Der Begriff IEP wird in Abgrenzung dazu wie bisher für den pH-Wert verwendet, an dem Proteine und kleinere Moleküle eine neutrale Nettoladung aufweisen, also formal elektrisch neutral vorliegen.

Dieser von Fukuzaki beschriebene Effekt fällt mit zunehmender Ionenstärke der Lösung größer aus. Dies liegt daran, dass die intermolekulare Repulsion durch *Charge Shielding* geschwächt wird und es darüber zu einer dichteren Packung der adsorbierten Moleküle auf der Oberfläche kommt [152]. Diese Überlegung funktioniert jedoch nur dann, wenn die Anziehung zwischen Protein und Oberfläche nicht ebenfalls durch ein *Charge Shielding* gesenkt wird. Die Erhöhung der Ionenstärke einer proteinhaltigen Lösung kann demnach zu vermehrter oder zu verminderter Adsorption führen, je nachdem ob die intermolekulare Interaktion oder die Protein-Oberflächen-Interaktion stärker durch die Ionenstärke beeinflusst wird.

Für sehr niedrige Ionenstärken entsprechend 10^{-3} mol/L fällt die Adsorption von BSA an *Stainless Steel*, mit einem Maximum bei pH 4,7 bis pH 5, deutlich (ca. -80 %) geringer aus als bei höheren Ionenstärken (10^{-1} mol/L) [147]. Das Maximum erklärt sich durch die bei diesem pH-Wert geringe intermolekulare Repulsion der Proteine in der Nähe des IEP bei ansonsten fehlendem *Charge Shielding*. Der Effekt des *Charge Shieldings* hat hier den größeren Einfluss auf die absorbierte Proteinmenge als der pH-Wert der Lösung.

Es wird beim Sichten der Vielzahl an Literatur zum Thema Proteinadsorption klar, dass man selbst für ein Protein und eine Oberflächenspezies kaum eine konsistente Aussage treffen kann, da eine Änderung von pH, Ionenstärke, Art der Ionen, Temperatur oder anderer Parameter zu einer Änderung des Zusammenspiels der beiden potentiellen Bindungspartner führt. Jedoch lässt sich feststellen, dass BSA und andere als "weich" eingeordnete Proteine, wie Myoglobin und Immunglobuline, verstärkt und oberflächenunabhängig zur Adsorption neigen im Gegensatz zu sogenannten harten Proteinen, wie Lysozym [149]. Und es scheint erwiesen, dass *Stainless Steel*-Oberflächen Proteine im großen Umfang (> 15 mg/m²) zu adsorbieren vermögen [147, 148].

Diese Untersuchungen gaben Anlass, den Einfluss von Stahl- aber auch anderen Oberflächen in einer HPLC-Anlage zu überprüfen. Mittels zweier unterschiedlicher Methoden wurden Untersuchungen durchgeführt, zum einen mittels UV-Detektion und zum anderen mittels HR-CS-AAS.

6.3.1 Versuchsaufbau und verwendete Oberflächen

Der Versuchsaufbau sollte die Messung von Adsorptionsverlusten mittels UV-Detektion ermöglichen. Hierzu wurden Stahlleitungen aus der HPLC-Anlage durch PEEK-Kapillaren ersetzt, die eine geringe Proteinadsorption zeigen sollen [104, S. 65–66, 155].

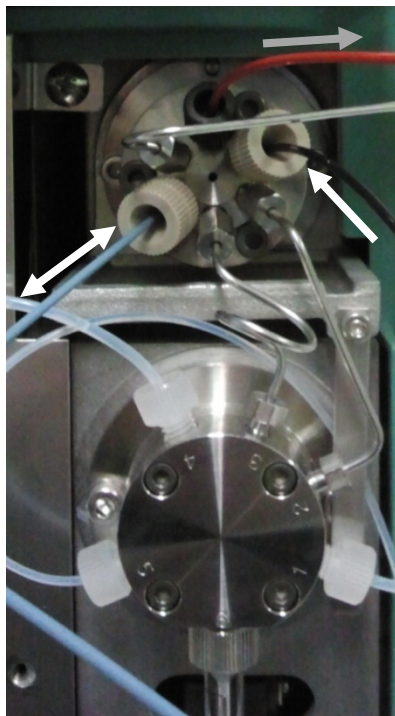


Abbildung 6.3 - Zwei Schaltventile der verwendeten HPLC-Anlage (s. Kapitel 8.1). Die Pfeile zeigen die Flussrichtung in den Leitungen an. Die Leitung, die durch den grauen Pfeil markiert ist, verbindet das Ventil mit der Trennsäule bzw. zeigt in Richtung Detektor. Der weiße Doppelpfeil zeigt die PEEK-Kapillare an, die die Probenschleife ersetzt, und der einfache weiße Pfeil zeigt die Verbindung aus PEEK an, welche zwischen Injektionsport und Ventil angebracht wurde.

Es wurden nur diejenigen Leitungen ersetzt, die Probenkontakt haben. Da die Leitungen unterschiedliche Aufgaben erfüllen müssen und daher unterschiedliche Volumina aufweisen, mussten PEEK-Kapillaren unterschiedlicher Durchmesser und Länge gewählt werden (s. Abbildung 6.3 und Tabelle 6.1).

Funktion des Bauteils	PEEK Kapillare und deren Dimension	Herkömmliches Bauteil
Probenschleife	PEEK-Kapillare (blau) 0,25 mm x 1,52 m Volumen: 77,0 µL Oberfläche: 1193 mm ²	<i>Stainless Steel</i> -Kapillare 0,5 mm x 0,7 m Volumen: 137 µL Oberfläche: 1100 mm ²
Verbindung Schaltventil - Säule	PEEK-Kapillare (rot) 0,13 mm x 0,45 m Volumen: 5,97 µL Oberfläche: 183 mm ²	<i>Stainless Steel</i> -Kapillare 0,25 mm x 0,35 m Volumen: 17,2 µL Oberfläche: 275 mm ²
Verbindung Injektionsport - Schaltventil	PEEK-Kapillare (schwarz) 0,10 mm x 1,52 m Volumen: 11,9 µL	<i>Stainless Steel</i> -Kapillare 0,17 mm x 0,36 m Volumen: 8,17 µL

	Oberfläche: 477 mm ²	Oberfläche: 192 mm ²
Säule / Dummy	PEEK-Kapillare (braun) 0,063 mm x 1,52 m Volumen: 4,74 µL Oberfläche: 301 mm ²	SEC-Säule 300 x 7,8 mm Σ Partikeloberfläche (unporös) 5µm: 12,78 m ² 3µm: 58,97 m ²
	<i>Female-Female</i> Port Konnektor	

Tabelle 6.1 - Modifikation der HPLC-Anlage. Die Tabelle enthält auch die Maße und Volumina der verwendeten Kapillaren. Das Volumen des *Female-Female* Port Konnektors wird als vernachlässigbar klein angesehen. Für SEC-Säulen spielt das Volumen keine wirkliche Rolle und wird der Vollständigkeit halber angegeben. Auf die Oberfläche wird weiter unten im AAS-Versuch eingegangen. Zur Konfiguration siehe Abbildung 6.3 und Abbildung 6.4.

Auch die Adsorption von Proteinen durch das Säulenmaterial zweier Größenausschlusschromatographiesäulen wurde auf diese Weise untersucht, indem diese durch Säulendummies ersetzt wurden, um entsprechende Referenzwerte ermitteln zu können (s. Abbildung 6.4). Beim Versuchsaufbau unter UV-Detektion wurde mit zwei Eluentenmodifikationen (Ionenstärken) gearbeitet, um auch den Einfluss der Ionenstärke auf die Adsorption zu untersuchen. Für den Versuchsaufbau unter Verwendung der HR-CS-AAS musste hierfür ein neues Eluentensystem etabliert werden (s. Kapitel 6.3.3).

Die stationäre Phase der Trennsäulen unterscheidet sich von *Stainless Steel* in der Oberflächenladung, während PEEK keine Ladung trägt. Die Oberfläche der Silikagelpartikel weist auf Grund des niedrigeren ZPCs (je nach Modifikation zwischen 1,7-3,5) im Vergleich zu *Stainless Steel* eine stärker ausgeprägte, negative Ladung bei neutralem bis leicht saurem Eluenten auf (s.a. Kapitel 4.1.2.1). Hierdurch ergeben sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen ZPC und IEP von 4 pH-Einheiten oder mehr. Liegt der pH des Eluenten zwischen IEP und ZPC, ergibt sich für einen Großteil (bis zu 99 % bei $\Delta\text{pH} = 4$) der Proteinmoleküle die Möglichkeit



Abbildung 6.4 - Konfiguration mit Dummy als Säulenersatz. Das Bild zeigt die gewundene PEEK-Kapillare als rückdruckerzeugenden Dummy. Die Pfeile zeigen die *Female-Female* Port Konnektoren, welche ebenfalls als Säulenersatz verwendet wurden. Der Einsatz der PEEK-Kapillare als Säulendummy erhöht den Rückdruck und verbessert so die Funktionsfähigkeit der Pumpenventile

zur Ausbildung ausgeprägter elektrostatischer Attraktionen an der Oberfläche der stationären Phase.

6.3.2 Restriktorversuch mittels UV-Detektion

6.3.2.1 Detektionswellenlänge

Abweichend von den bisher erwähnten Proteinuntersuchungen, musste die Detektion für diese Versuche mit einer weniger empfindlichen Methode unter Verwendung von 280 nm als Detektionswellenlänge durchgeführt werden, da die zu untersuchenden Volumina mit bis zu 40 μL Proteinlösung bei einer Konzentration von 0,1 - 0,2 % (m/V) den linearen Bereich des Detektors überschritten hätten, würde bei 207 nm detektiert werden (s. Abbildung 6.5 und Abbildung 6.6). Dies liegt zum einen daran, dass bei 280 nm nur die aromatischen Strukturen an den entsprechenden Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin ausreichend stark absorbieren. (Histidin absorbiert auf Grund des geringer stabilisierten π -Elektronensystems bzw. geringerer Elektronendichte des Chromophors bei kürzeren Wellenlängen.) Bei Wellenlängen unter 220 nm wird verstärkt das Peptid-Rückgrat (engl.: *Peptide Backbone*) erfasst, wodurch sich höhere molare Absorptionskoeffizienten ergeben [156, S. 21–22].

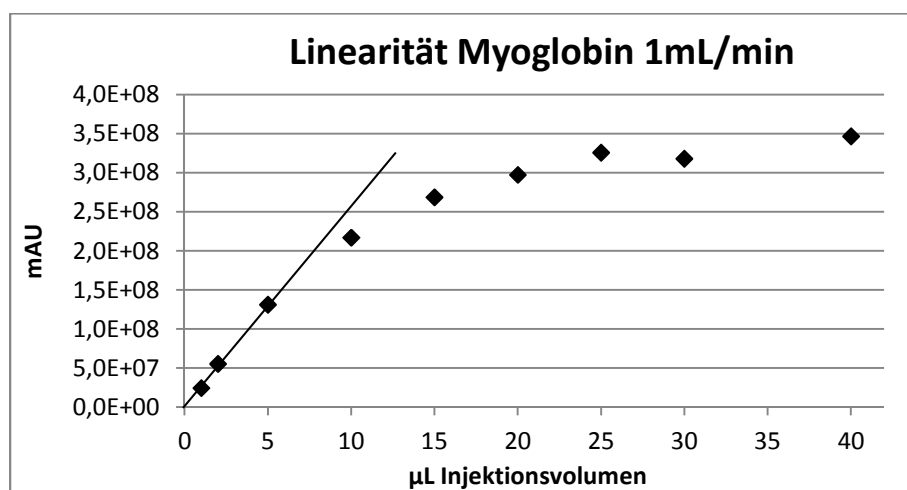


Abbildung 6.5 - Überschreiten des linearen Bereichs bei zunehmenden Injektionsvolumina einer 0,1 %igen Myoglobulinlösung. Die Detektionswellenlänge betrug 207 nm. Es wurde im Aufbau ein *Female-Female* Port als Säulendummy verwendet.

Ein weiterer Grund für das Überschreiten des linearen Bereiches ist, dass bei fehlender Trennsäule fast keine Diffusion der Proteine zwischen Injektion und Detektion geschieht. Durch die fehlende Probenzonenerbreiterung erreicht die gesamte injizierte Menge den

Detektor quasi zeitgleich. Daher wurde zuerst versucht, die Flussrate um die Hälfte zu reduzieren, um so die Probenzone zu verbreitern (s. Abbildung 6.6).

6.3.2.2 Diffusion - ganz ohne geht es nicht!

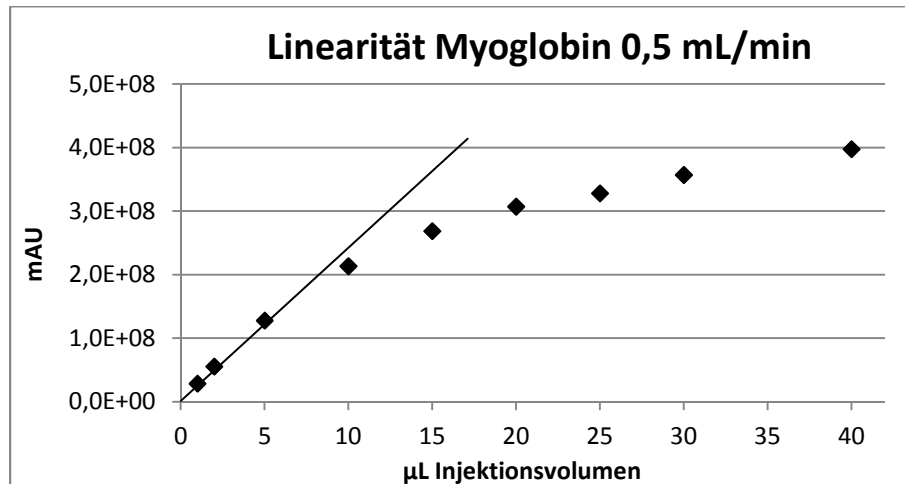


Abbildung 6.6 - Überschreiten des linearen Bereichs bei zunehmenden Injektionsvolumina einer 0,1 %igen Myoglobulinlösung. Die Detektionswellenlänge betrug 207 nm. Es wurde im Aufbau ein *Female-Female* Port als Säulendummy verwendet. Eine Senkung der Flussrate um 50 % vergrößerte den linearen Bereich nur unzureichend.

Da Kapillardurchmesser bzw. Volumen bei diesen Versuchen sehr gering ausfallen (s. Tabelle 6.1), führt eine Halbierung der Flussrate nicht zu einer Besserung der Linearität. Ohne die Verbreiterung der Probenzone, welche bei allen chromatographischen Prozessen auftritt, ist der lineare Bereich der Detektion bei 207 nm auf geringe Probenkonzentrationen beschränkt. Der Einsatz einer Trennsäule führt zu einer Verbreiterung der Probenzone (s.a. Kapitel 4.1.1) und zeigt daher sowohl für 207 nm als auch für 280 nm über einen weiten Bereich einen linearen Zusammenhang (s. Abbildung 6.7).

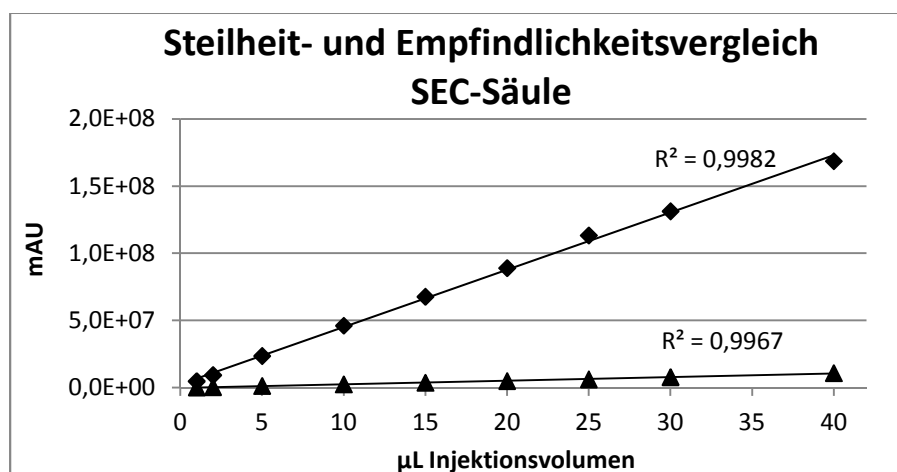


Abbildung 6.7 - Empfindlichkeit und Linearität bei 207 nm und 280 nm. Injiziert wurde eine Myoglobulinlösung (0,1 % m/V). Die verwendete Trennsäule war eine Yarra SEC-2000 von Phenomenex. Die Rauten zeigen die Werte für 207 nm, die Dreiecke die Werte für 280 nm an. Die Korrelationskoeffizienten (R^2) zeigen den linearen Zusammenhang für beide Wellenlängen an.

Die Detektion bei 280 nm ergibt für den getesteten Konzentrationsbereich der Proben einen linearen Zusammenhang zur Signalfäche auch ohne Trennsäule (s. Abbildung 6.8).

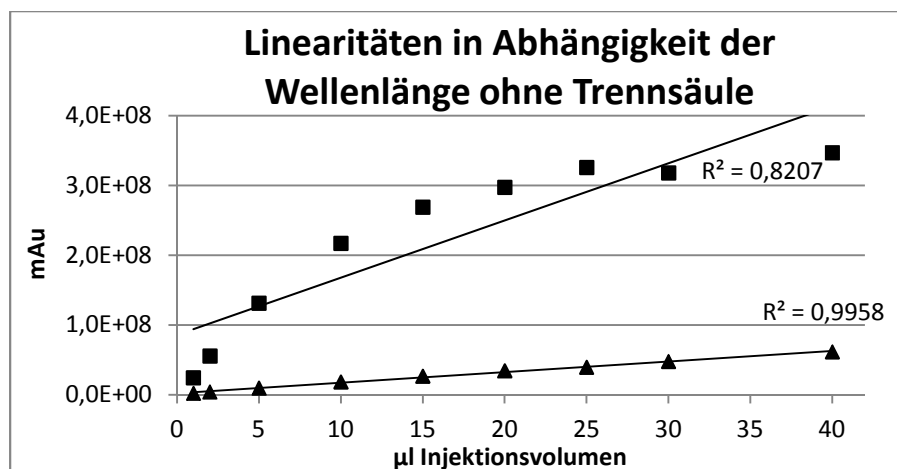


Abbildung 6.8 - Empfindlichkeit und Linearität bei 207 nm und 280 nm ohne Trennsäule. Injiziert wurde eine Myoglobinlösung (0,1 % m/V). Es wurde im Aufbau ein *Female-Female* Port als Säulendummy verwendet. Die Quadrate zeigen die Werte für 207 nm, die Dreiecke die Werte für 280 nm an. Bei 280 nm liegt der Korrelationskoeffizient auf dem Niveau der Trennsäule.

6.3.2.3 Einfluss der Ionenstärke

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der Ionenstärke des Eluenten auf die Adsorption an probenführenden Materialien (s. Tabelle 6.1) für drei Lösungen von den Modellproteinen BSA (0,1 % m/V), Myoglobin (0,1 % m/V) und einem IgG Antikörper (0,2 % m/V) geprüft. Hierzu wurde von jeder Proteinlösung eine Serie von drei aufeinanderfolgenden Injektionen zu je 20 µl für vier Gerätekonfigurationen jeweils mit modifiziertem und idealem Eluenten durchgeführt:

- 1) Eine SEC-Säule mit 5 µm-Partikeln (Biosep® S 3000), Standardkonfiguration
- 2) Eine SEC-Säule mit 3 µm-Partikeln (Yarra® SEC 2000), Standardkonfiguration
- 3) Connector-Dummy und PEEK-Kapillare
- 4) Connector-Dummy und *Stainless Steel*-Kapillare

Der Vergleich der Flächen untereinander lässt Schlüsse auf die relative Absorptionsneigung der Materialien zu. Außerdem können auf diese Weise Sättigungseffekte für die Materialien erkannt werden. Um eine gegenseitige Beeinflussung durch adsorbierte Proteine zu minimieren, wurde nach jeder Serie eine Spülprozedur durchgeführt. Mit PBS bei pH 3 und destilliertem Wasser sowie durch Blank-Injektionen wurden anhaftende Proteine entfernt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 aufgeführt.

Δ_{AUC} [%]	IgG	BSA	Myoglobin
Stainless Steel (Standardkonfig.)	- 1,22	+ 0,363	+ 1,74
PEEK	- 13,6	- 9,08	- 31,1
Biosep® S 3000 (5 μ m)	+ 310 ¹	+ 21,0	+ 4,10
Yarra® SEC 2000 (3 μ m)	+ 23,8	+ 27,1	+ 35,7

Tabelle 6.2 - Differenzen der relativen Signalintensitäten von idealem zu modifiziertem Trennmodus. Die Zahlen geben die Differenz der Flächen normiert auf den idealen Modus an. Positive Werte zeigen daher an, dass die registrierten Signale im idealen Modus höher ausfallen als im modifizierten Modus. Verglichen wird damit das Adsorptionsverhalten innerhalb der gleichen Gerätekonfiguration bei unterschiedlichen Ionenstärken.

¹Chromatogramme zeigten für den modifizierten Modus keine sinnvoll integrierbaren Signale (uneinheitliche Peakform).

Die beiden Trennsäulen zeigen im modifizierten Modus geringere Signale als im idealen. Dies widerspricht der bislang erwähnten Literatur, wonach die Adsorption mit steigender Ionenstärke zunimmt.

Der Kommentar zum Europäischen Arzneibuch schreibt zur Ausschlusschromatographie: *"Die Teilchengrößen-Ausschluss-Chromatographie (SEC, size exclusion chromatography) unterscheidet sich von allen chromatographischen Verfahren vor allem darin, dass keine stationäre Phase existiert und somit auch keine Wechselwirkung zwischen zwei Phasen – also kein energetischer Effekt – zu einer Trennung führt."* [108]. Dass Kieselgel Proteine aufgrund Coulomb'scher Interaktionen adsorbiert, wurde jedoch in diversen Arbeiten gezeigt [8, 153, 157, 158]. Die Trennung im modifizierten Modus beruht sogar auf diesen Wechselwirkungen [113]. Man darf erwarten, dass es sich bei diesen Adsorptionen nicht oder nur im geringen Umfang um kovalente bzw. andere dauerhafte Bindungen zwischen Protein und Silikagel handelt. Ein Großteil der Proteine durchläuft kieselgelbasierte Trennsäulen nach dem Prinzip eines inversen Siebes ohne weitere Interaktionen, ein Teil jedoch adsorbiert gerade in dem Maße dauerhaft, dass keine Zuordnung zu einem Signal im entstehenden Chromatogramm mehr möglich ist. Die Desorption erfolgt, wenn nicht durch Reinigungsschritte forciert (s. Abbildung 6.9), stetig und geht auf diese Weise im Grundrauschen der Basislinie unter. Dieser Effekt fällt konsequenterweise dann größer aus, wenn größere Oberflächen, wie in Trennsäulen, zur Verfügung stehen. Geht die Adsorption auf elektrostatische Interaktionen zurück, so fällt diese Art der Adsorption für geringe Ionenstärken des Eluenten höher aus. Das Verringern der Repulsion zwischen adsorbierten Proteinmolekülen spielt auf Grund der Größe der in Trennsäulen vorliegenden Oberfläche eine untergeordnete Rolle.

Steht weniger Oberfläche zur Verfügung, kann aber eine Beeinflussung der Ladung der Proteine durch den pH-Wert einerseits zu einer Beeinflussung der Protein-Oberflächen-Interaktionen, andererseits zu einer Beeinflussung der Protein-Protein-Interaktionen führen.

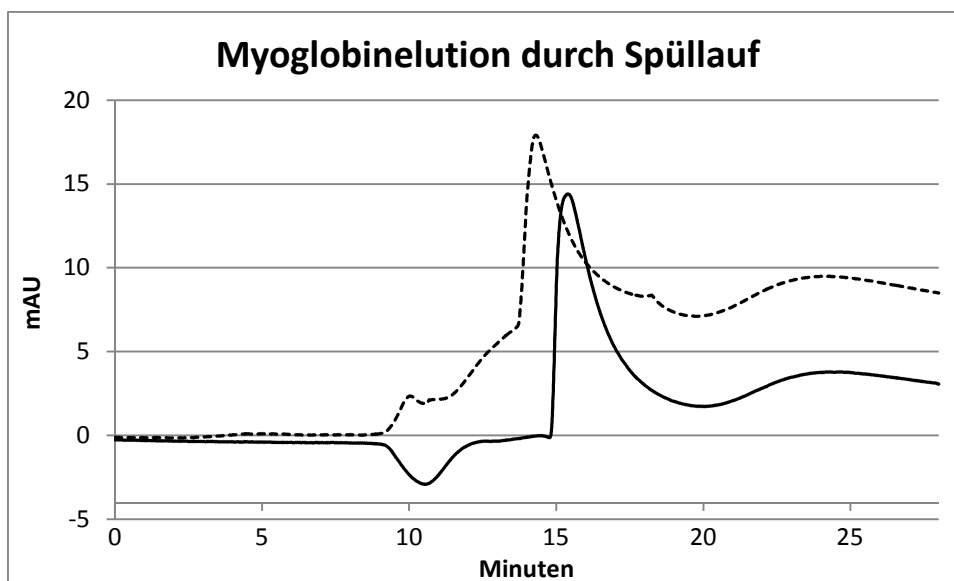
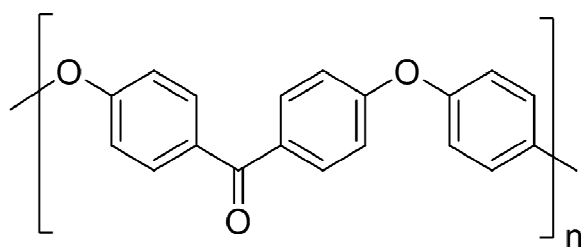


Abbildung 6.9 - Chromatogramm eines Spüllaufes, aufgenommen bei der für aromatische Aminosäuren charakteristischen Wellenlänge von 280 nm. Die gestrichelte Linie zeigt einen Spüllauf nach 3 Läufen im modifizierten Modus, die durchgehende Linie den Spüllauf nach 3 Injektionen im idealen Modus. Eingesetzt war eine Trennsäule (Yarra® SEC 2000, 3 µm). Eluent war ein Phosphatpuffer 0,1 mol/L pH 3,0 bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Signale bei Minute 15 gehen auf anhaftendes Myoglobin zurück, welches durch die Spüllösung vom Säulenmaterial entfernt wird.

Bei Betrachtung von Abbildung 6.9 erscheint es möglich, einen Rückschluss auf die durch den Spüllauf entfernte Proteinmenge zu ziehen. Jedoch zeigen die Signalformen häufig Abweichungen. Vor allem, wenn zur Reinigung organische Lösemittel und Tensidlösungen mit stark unterschiedlichen (Eigen-)Absorptionskoeffizienten verwendet werden, kommt es neben der Signaldeformation zu Fehlern bei der Quantifizierung. Außerdem ändert sich durch das Lösemittel der molare Absorptionskoeffizient des Proteins, wodurch sich ein quantitativer Vergleich verbietet. Aber auch unterschiedliche Ionenstärken und extreme pH-Werte können so geartete Störungen verursachen.

Die Werte für die Stahlkapillare zeigen keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Trennmodi. Die PEEK-Kapillare reagiert jedoch deutlicher auf den Unterschied in der Ionenstärke.



LogP: 5,14

Abbildung 6.10 - Struktur vom Polyetheretherketonmolekül. Der logP-Wert zeigt die starke Hydrophobizität des Monomers an. Zeichnung und logP-Wert wurden mit BioChemdraw erstellt.

Die stark hydrophobe Oberfläche (s. Abbildung 6.10) interagiert verstärkt mit den durch *Charge Shielding* bei hohen Ionenstärken hydrophobisierten Proteinen. Im modifizierten Modus treten die Eigenladungen der Proteine in den Vordergrund, wodurch die Adsorption geringer ausfällt.

Protein / Modus	PEEK	Stahl	Differenz PEEK-Stahl absolut	% v. PEEK
BSA Modifiziert	2550881	2453857	97024	+ 3,80
IgG Modifiziert	13414768	12838109	576659	+ 4,30
Myoglobin Modifiziert	7037234	6687466	349768	+ 4,97
BSA Ideal	2319140	2462761	-143621	- 6,19
IgG Ideal	11587185	12681824	-1094639	- 9,45
Myoglobin Ideal	4851640	6803742	-1952101	- 40,2

Tabelle 6.3 - Peakflächen absolut und relativ für die Gerätekonfiguration ohne Trennsäule, für PEEK- und *Stainless Steel* Kapillare im modifizierten und idealen Modus. Die prozentualen Angaben verwenden die PEEK-Signalfächen als Basis. Negative Werte zeigen daher an, dass eine vermehrte Adsorption auf PEEK stattgefunden hat.

Der Literatur entsprechend, fallen die registrierten Signale im idealen Modus geringer aus als im modifizierten Modus, wenn man die PEEK-Kapillaren betrachtet. Vergleicht man die Werte für ein Protein bei idealem und modifiziertem Modus, werden jeweils die geringsten Signalintensitäten für den idealen Modus unter Verwendung von PEEK-Kapillaren erhalten. Im modifizierten Modus zeigte Stahl im Vergleich zu PEEK geringere Werte, also eine höhere Adsorption für alle drei Proteine.

Bei dem pH-Wert von 6,8 ist *Stainless Steel* leicht negativ geladen. Für das bei diesem pH-Wert überwiegend elektrostatisch neutral vorliegende Myoglobin (IEP 6,9) sind die repulsativen elektrostatischen Kräfte gering. BSA (IEP 5,2 - 5,5) und Ovalbumin (IEP ca. 4,8) liegen vom Betrag her negativ vor (s. Tabelle 2.1) und erfahren daher eine gewisse Repulsion von der gleichgerichtet geladenen Stahloberfläche. Für alle drei Proteine liegt eine hohe Verformbarkeit vor, die eine Adsorption auch bei entgegengesetzter Nettoladung ermöglicht (s. Kapitel 6.4). Die Triebkraft für diese Adsorption ist die Zunahme an konformationaler Entropie [149, 159], welche hier der elektrostatischen Abstoßung überwiegt.

Es wurden Serien mit steigenden Injektionsvolumina durchgeführt um eine Abhängigkeit der Adsorption von der vorliegenden Proteinmenge zu untersuchen. Dabei zeigt sich in der Gerätekonfiguration ohne Trennsäule ein geringer Unterschied zwischen *Stainless Steel* und PEEK, der mit steigendem Injektionsvolumen zunimmt (s. Abbildung 6.11). Jedoch zeigen die Konfidenzintervalle an, dass diese Werte innerhalb des Streumaßes liegen.

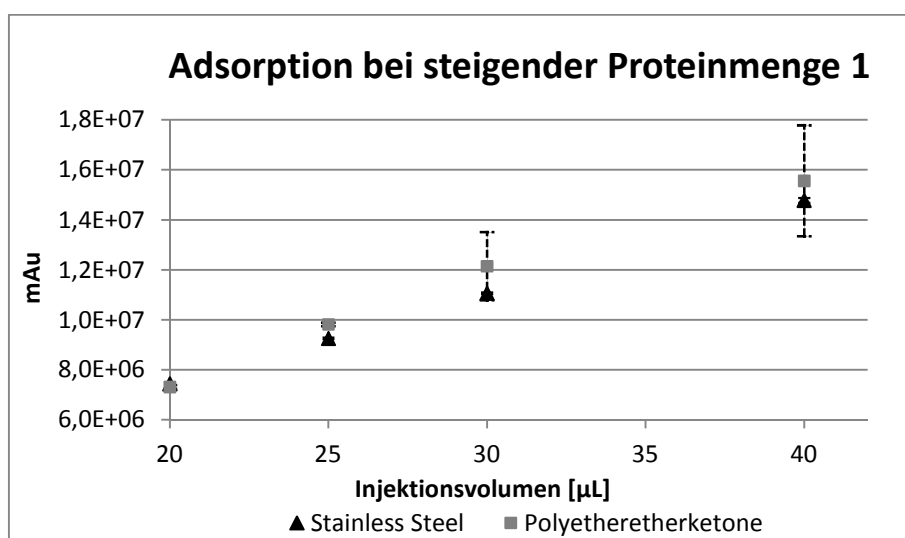


Abbildung 6.11 - Signalfächen von Injektionen steigender Volumina einer Myoglobulinlösung (0,1 % m/V). Dargestellt sind die Ergebnisse für die Konfigurationen ohne Trennsäule im mSEC Modus. PEEK zeigt für die dargestellten höheren Injektionsvolumina respektive Mengen die geringere Adsorption. Die Konfidenzintervalle zeigen jedoch an, dass dieser Unterschied nicht sehr ausgeprägt ist.

Die Konfiguration mit eingesetzter Trennsäule zeigte eine im Vergleich zum PEEK-Dummy signifikant geringere Wiederfindung, bei guter Linearität (s. Abbildung 6.12). Der stark lineare Zusammenhang verrät jedoch, dass sich die adsorbierte Menge nicht durch das veränderte Injektionsvolumen beeinflussen lässt.

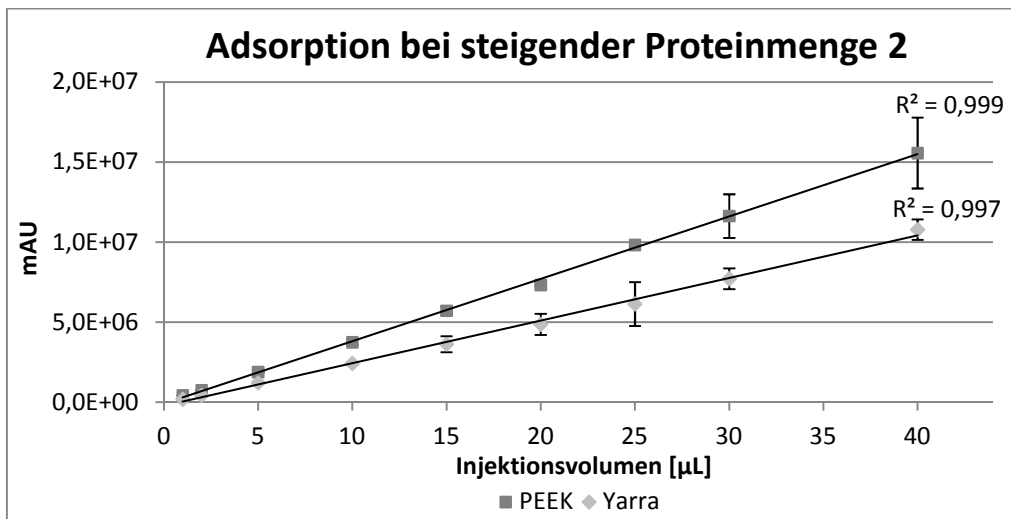


Abbildung 6.12 - Vergleich der Signalintensität bei Verwendung von Trennsäule und PEEK-Dummy im mSEC-Modus bei unterschiedlichen Injektionsvolumina.

Normiert man die Flächen der Signale über das Injektionsvolumen erhält man einen guten Eindruck davon (s. Abbildung 6.13). Lediglich bei den geringsten Volumina von 1 µL und 2 µL zeigen sich Unterschiede. Hier scheint auf der Trennsäule mehr adsorbiert zu werden. Diese Beobachtung egalisiert sich bei höheren Volumina jedoch vollständig.

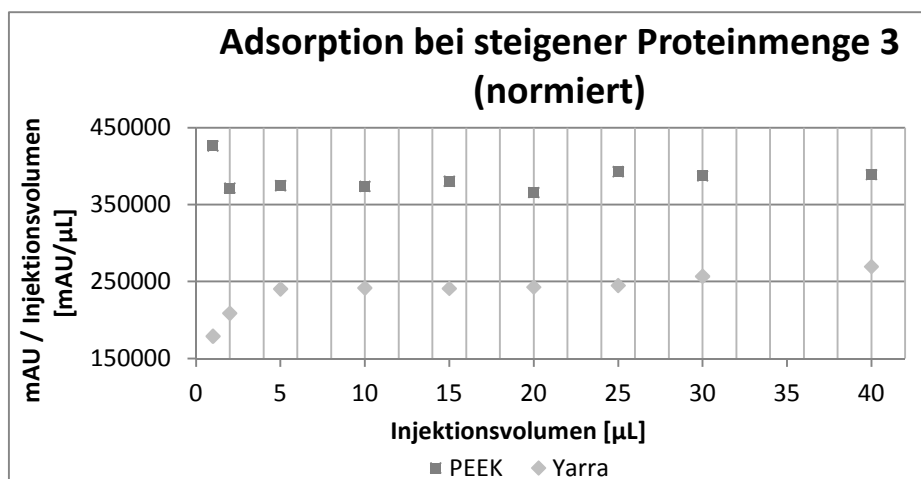


Abbildung 6.13 - Normierung der Signalfächen aus Abbildung 6.12 über das Injektionsvolumen. Bei Abhängigkeit der Adsorption von der Menge müsste hierbei eine Steigung durch die Datenpunkte beschrieben werden. Der steigungslose Verlauf zeigt an, dass keine solche Abhängigkeit unter flüssigchromatographischen Bedingungen besteht.

Dies zeigt, dass unter chromatographischen Bedingungen Proteine unabhängig von der vorliegenden Menge adsorbiert werden. Große Oberflächen, wie die stationären Phasen von Trennsäulen, bieten mehr Interaktionspunkte als dünne Kapillaren und können so die detektierbare Probenmenge zumindest scheinbar reduzieren, indem die vorübergehend adsorbierten Proteine nur verzögert freigegeben werden. Die Ionenstärke des Eluenten beeinflusst die adsorbierte Menge nicht gleichermaßen. Sie nahm in den Versuchen für die hydrophobe PEEK-Oberfläche bei hoher Ionenstärke und für hydrophilere Oberflächen wie *Stainless Steel* und Silicagel bei niedriger Ionenstärke relativ gesehen zu. Die verwendeten Oberflächendimensionen der Kapillaren haben jedoch keinen eklatanten Unterschied in der adsorbierten Menge zwischen PEEK und *Stainless Steel* gezeigt.

Es fehlt an dieser Stelle jedoch eine Aussage über die absolute Menge, die auf diese Weise scheinbar verloren geht. Eine Summation der Signalfächen aus Proben- und Spülläufen kommt aus o.g. Gründen nicht in Frage. Daher wurde mit der HR-CS-AAS eine orthogonale Technik eingesetzt, die dazu in der Lage ist, diese Aussage zu treffen.

6.3.3 Restriktorversuch mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Zur Bestimmung von Proteinen mittels Atomabsorptionsspektrometrie bedarf es eines Metalloproteins wie Myoglobin. Myoglobin trägt eine Häm-Funktion, die ein Eisenatom komplexiert (s. Abbildung 6.14). Dieses Eisenatom kann atomspektrometrisch erfasst werden, um so eine Quantifizierung des Myoglobins vorzunehmen.

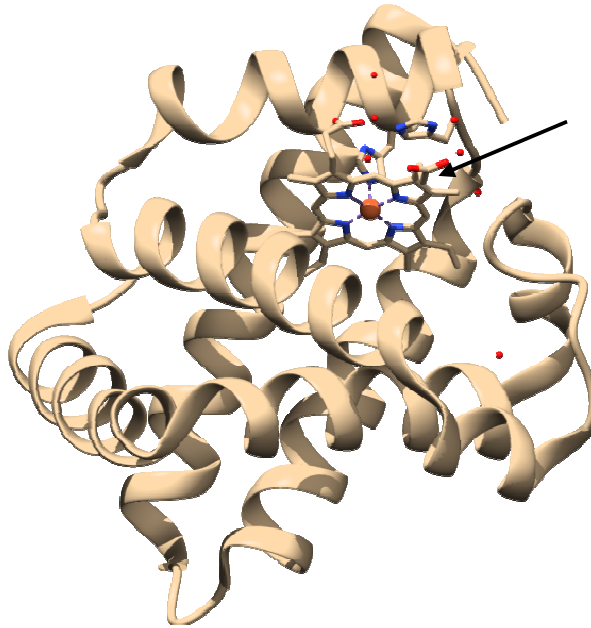


Abbildung 6.14 - Gezeigt ist ein Myoglobinmolekül vom Pferdeherz mit Häm-Funktion (Pfeil). In der Häm-Funktion ist das Eisenatom von der Aminosäure Histidin fünffach koordinativ gebunden. Die Zeichnung wurde aus der Kristallstruktur PDB: 5cn7 [160] mit UCSF Chimera (Version 1.10.2) erstellt. Phosphatmoleküle wurden aus der Struktur zwecks besserer Übersicht entfernt.

Der Versuchsaufbau zur Myoglobinquantifizierung gleicht dem der UV-Detektion. Hier wurde jedoch der Eluent hinter dem Detektor in Vials für den Autosampler des Atomspektrometers (AAS-Vials) aufgefangen. Diese bestehen aus Polystyrol (s. Abbildung 6.15). Dieses zeigt wie PEEK eine hohe Hydrophobizität. Aus vorangegangenen Beobachtungen geht hervor, dass auf solchen Oberflächen die Verwendung eines modifizierten Eluenten für die HPLC zu bevorzugen ist, da dies zu einem vermindertem *Charge Shielding* der Proteine führt. Über Polystyrol ist bekannt, dass es eine hohe Dichte an Bindungsstellen aufweist [150, S. 16], was jedoch nicht zwingend eine vermehrte Adsorption von Proteinen bedeutet, da durch gegenseitige sterische und elektrische Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen die Adsorption reguliert wird.

Die Fraktionen wurden jeweils für genau eine Minute bei einer Flussrate von 1,0 mL/min gesammelt. Die Präzision dieses Verfahrens wurde durch die Qualifizierung der Fließmittelpumpe einerseits und durch Auswägung einer Fraktionsreihe andererseits sichergestellt. Die Präzision dieser manuellen Fraktionierung lag für n=28 Fraktionen bei 1,09 %.

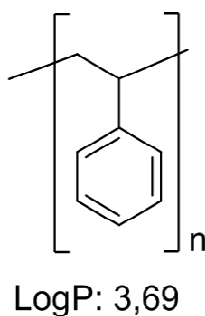


Abbildung 6.15 - Strukturformel des Polystyrol-Monomers. Zeichnung und logP-Wert wurden mit BioChemdraw erstellt. Mit zunehmender Kettenlänge steigt die Hydrophobizität der Struktur.

Die auf diese Weise gesammelten Fraktionen wurden bis zur Messung zugedeckt gelagert, um die Proben vor Kontamination zu schützen. In ersten Versuchen wurden die Fraktionen in Mikroreaktionsgefäßen aus Polypropylen gesammelt. Dies verursachte einen zusätzlichen Arbeits- und Umfüllschritt, der wiederum den Einsatz von Mikropipettierspitzen verlangte, die zusätzliche Adsorptionseffekte und Kontaminationsrisiken aufweisen. Zusätzlich erwiesen sich die Probengefäße der AAS unter starker Vergrößerung deutlich glatter und präsentieren daher weniger Oberfläche (s. Abbildung 6.16).

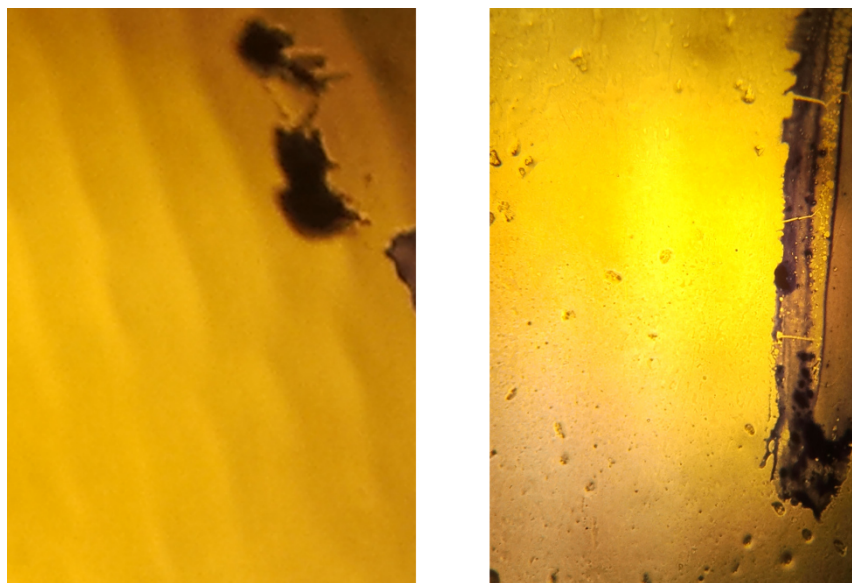


Abbildung 6.16 - Lichtmikroskopische Aufnahmen von einem AAS-Probenvial aus Polystyrol (links) und einem Mikroreaktionsgefäß aus Polypropylen (rechts). Die Aufnahme erfolgte mittels Lichtmikroskop der Firma CarlZeiss unter Verwendung eines 10/0,22 Objektivs und CarlZeiss CPL W10x/18 Okularen. Die dunklen Strukturen rechts auf den Abbildungen sind Markierungen zur Tiefenfindung in der Darstellung.

Durch die größeren Durchmesser ergab sich außerdem ein geringeres Oberflächen/Volumen Verhältnis (AAS-Vial: $0,42 \text{ m}^{-1}$; Mikroreaktionsgefäß: $0,53 \text{ m}^{-1}$), sodass durch ein Sammeln in

den AAS-Vials von der geringstmöglichen Störung durch Adsorption ausgegangen werden konnte.

6.3.3.1 Wahl des Eluenten und Methodenharmonisierung

Die Wahl des Eluenten erfolgte vorerst aus chromatographischen Gesichtspunkten und fiel auf einen niedrig konzentrierten Phosphatpuffer, da dieser sich in vergangenen Versuchen etabliert hatte. Der Pufferbereich liegt im physiologischen Bereich (pH 5,4 - 8,0), weshalb er sich gut für Proteine eignet, außerdem zeigt er keine nennenswerte UV-Absorption und ist daher auch für die HPLC geeignet.

Eine Messung unter Verwendung dieses Eluenten machte jedoch klar, dass selbst geringe Phosphatkonzentrationen keine atomspektrometrische Messungen zulassen, da Phosphat ein breitbandiges und hohes Untergrundsignal verursacht, welches auch die Resonanzlinie von Eisen überlagert (s. Abbildung 6.17).

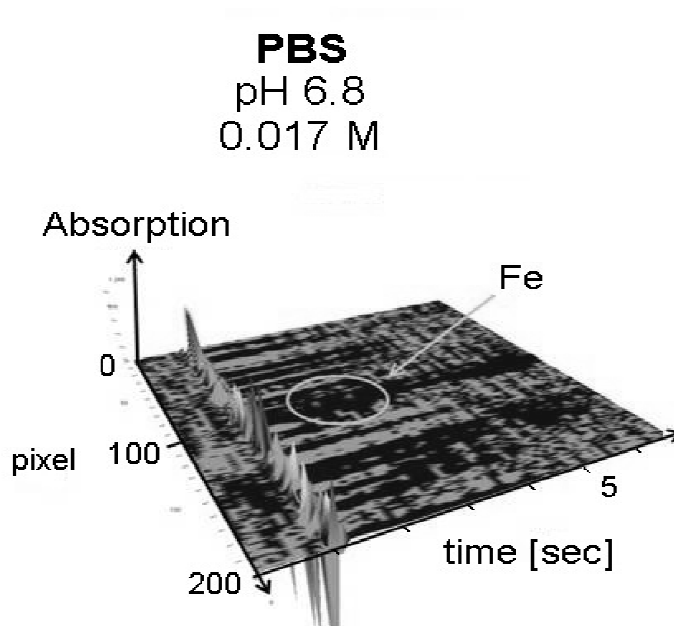


Abbildung 6.17 - Spektrum gemessen mit HR-CS-AAS. Auf der X-Achse sind die Pixel des Detektors skaliert. In der Abbildung stellt jeder Pixel eine spektrale Bandbreite von 1 pm dar. Auf der Z-Achse ist die Zeit in Sekunden skaliert. Auf der Y-Achse ist die Absorption in Absorptionseinheiten dargestellt. Als Probe wurde eine Myoglobinlösung in modifiziertem Phosphatpuffer (17 mmol/L pH 6,8) verwendet. Man sieht außer phosphatbedingten Störsignalen Teile des Eisensignals, verursacht durch die Häm-Gruppe des Myoglobins in der Mitte des Spektrums (s. Markierung). Die Messung erfolgte auf der primären Eisenresonanzlinie bei 248,327 nm.

Es musste daher ein neues Puffersystem gefunden werden, das im physiologischen Bereich puffert, aber in der AAS keine Störsignale verursacht. Die Wahl fiel auf einen 2-(N-

Morpholino)ethansulfosäure (MES)-Puffer, der diese beiden Bedingungen erfüllt. Da es sich um eine organische Struktur handelt, kann diese während der Pyrolyseschritte des Temperaturprogramms entfernt werden und stört die Messung der Atomabsorption daher nicht. Problematisch ist die UV-Absorption des MES-Moleküls in der HPLC, die auch bei geringen Konzentrationen zu Störmeldungen des Detektors führte, wenn bei Wellenlängen unter 220 nm detektiert wurde. Um eine sinnvoll verwendbare Wellenlänge auszumachen, wurden UV-Spektren von Myoglobin und zwei unterschiedlich stark konzentrierten MES-Pufferlösungen aufgezeichnet (s. Abbildung 6.18). Für eine Detektionswellenlänge von 280 nm, bei der in Proteinen bevorzugt die aromatischen Strukturen der Aminosäuren erfasst werden, zeigen beide Pufferlösungen nur geringe Absorption. Es wurde schließlich der gering konzentrierte MES-Puffer für die Versuche verwendet, da kommerziell erhältliches MES außerdem mit Eisen kontaminiert ist, wodurch bei höheren MES-Konzentrationen erhöhte Blindwerte in der atomspektrometrischen Messung entstanden wären.

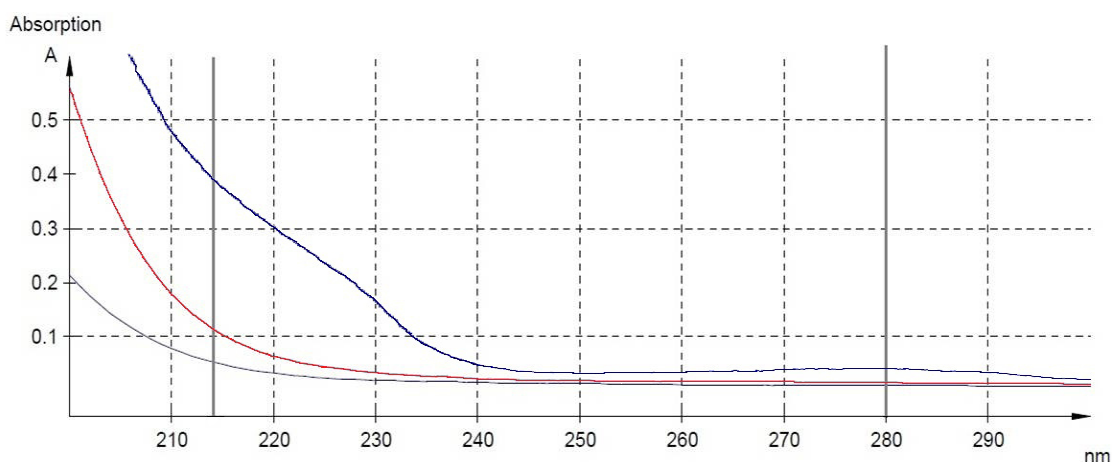


Abbildung 6.18 - UV-Spektren von MES-Puffer 0,01 mol/L (grau), MES-Puffer 0,2 mol/L (rot) und Myoglobin in Wasser (dunkelblau). Die Spektren wurden mit einem Specord 40® der Firma analytikjena aufgezeichnet.

Der niedermolare Puffer bestehend aus 0,01 mol/L MES zeigte jedoch eine Verschlechterung des chromatographischen Profils in der HPLC. Es erfolgte daher eine Erhöhung der Ionenstärke der Lösung mit hochreinem Kaliumchlorid auf die aus dem modifizierten PBS-Puffer bekannten 17 mmol/L (Ionenstärke) (s. Abbildung 6.19). Auch für das verwendete Kaliumchlorid lag eine Kontamination mit Eisenionen vor, daher konnte die Ionenstärke nicht auf das Niveau des idealen Modus angehoben werden. Eisenfreie Chemikalien sind, wenn erhält-

lich, extrem teuer. Die Kontaminationsrisiken für Proben werden in Kapitel 6.3.3 besprochen. Die Harmonisierung der beiden Gerätetechniken war mit diesem Schritt vollendet.

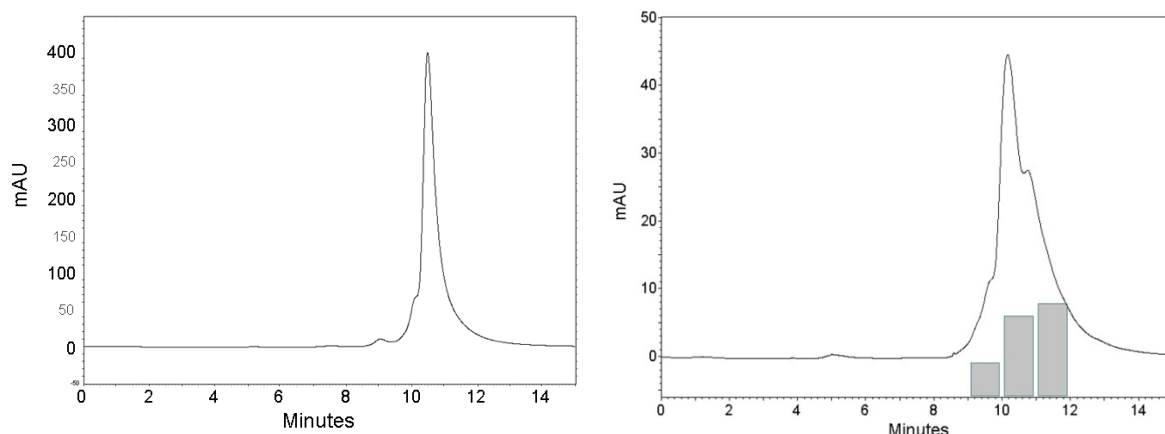


Abbildung 6.19 - Chromatogramme von Myoglobin unter Verwendung von modifiziertem PBS Puffer pH 6,8 (links) und unter Verwendung von modifiziertem MES-Puffer pH 6,8 (rechts) nach dem Angleich der Ionenstärke auf 17 mmol/L. Die grauen Balken im rechten Chromatogramm stehen für die in den entsprechenden Fraktionen wiedergefundenen Eisen- bzw. Myoglobinwerte.

Für einen Liter dieses Eluenten werden lediglich 1,95 g MES und 0,58 g Kaliumchlorid benötigt. Die atomspektrometrisch registrierten Spektren dieses Eluenten zeigen sich bei der Myoglobinbestimmung störungsfrei (s. Abbildung 6.20).

MES-buffer pH 6.8 0.01 M

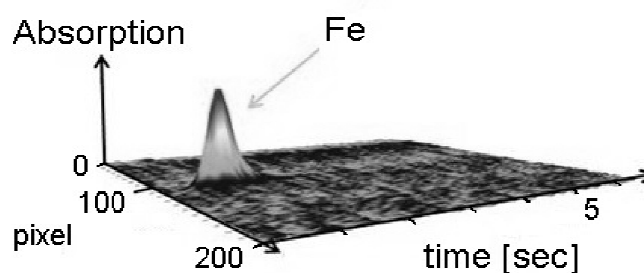


Abbildung 6.20 - Spektrum gemessen mit HR-CS-AAS. Auf der X-Achse sind die Pixel des Detektors skaliert. In der Abbildung stellt jeder Pixel eine spektrale Bandbreite von 1 pm dar. Auf der Z-Achse ist die Zeit in Sekunden skaliert. Auf der Y-Achse ist die Absorption in Absorptionseinheiten dargestellt. Als Probe wurde eine Myoglobinlösung in modifiziertem MES-Puffer (0,01 mol/L, pH 6,8) verwendet. Man sieht das durch die Häm-Gruppe verursachte Eisensignal. Die Messung erfolgte auf der primären Eisenresonanzlinie bei 248,327 nm.

6.3.3.2 Methodenentwicklung und Optimierung

Erste Messungen von gesammelten Fraktionen nach Methodenharmonisierung zeigten störungsfreie Spektren bei gleichzeitig hohen relativen Standardabweichungen innerhalb einer Probe. Die Gerätesoftware Aspect CS (Version 1.5.6.0.) beinhaltet ein sogenanntes "Kochbuch" (so lautet die Bezeichnung dieses Nachschlagewerkes innerhalb der Software), welches Vorschläge zu Temperaturprogrammen für diverse Elemente enthält. Die schließlich angewandte Methode basierte auf einer Methode aus dem "Kochbuch". Diese Methode wurde zunächst einer Optimierung der Pyrolyse und Atomisierungstemperatur unterzogen. Dies erfolgte von der Software gestützt durch Aufzeichnen von Pyrolyse- bzw. Atomisierungskurven (s. Abbildung 6.21). Für die Erstellung der Pyrolysekurve wurde mit einer Schrittweite von $\Delta_T = +50^\circ\text{C}$ bei gleichbleibender Atomisierungstemperatur mehrmals dieselbe Probe analysiert. Dies wurde solange fortgeführt bis das Signal, das durch Elementabsorption verursacht wurde, sank, weil die Probe während der Pyrolyse in die Gasphase überführt wurde und somit verloren ging. Man verwendet diejenige Temperatur zur Pyrolyse, die kurz unterhalb dieser Temperatur liegt. Für die Atomisierungskurve verfährt man analog bei der ermittelten maximalen Pyrolysetemperatur, wählt aber die niedrigste Temperatur nach Erreichen des Absorptionsmaximums der Probe, um Störungen zu vermeiden. Auf diese Weise erhält man eine hohe Signalintensität und kann ein Maximum an Matrix entfernen.

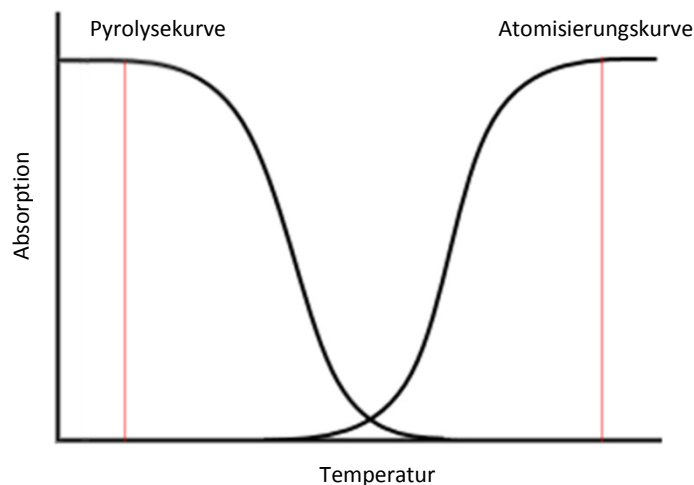


Abbildung 6.21 - Schema zum Ermitteln einer optimierten Pyrolysetemperatur (links) und Atomisierungstemperatur (rechts). Die roten Linien zeigen die idealen Temperaturen für Atomisierung und Pyrolyse an.

Jedoch führte diese Methodenoptimierung nicht zu einer Besserung der Präzision. Eine Ursache für Störungen bei der Verwendung von Autosamplern in der Graphitrohrtechnik ist

aus Zellassays bekannt. Dort steht man häufig vor dem Problem, dass in der zu vermessenden Zellsuspension die festen Bestandteile mit der Zeit sedimentieren und man daher bei längerer Stehzeit der Suspensionen im Autosampler sinkende Signale registriert. Es ist anzunehmen, dass ein ähnliches Problem auch bei den Messungen der myoglobinhaltigen Fraktionen vorlag. Außerdem soll die Vermessung von eisenhaltigen Proben unter Zusatz von Salpetersäure erfolgen (Kochbuch - Eintrag: Eisen Aspect (Version 1.5.6.0.)). Nachdem die Fraktionen gesammelt wurden und nach Zugabe von 0,5 % Salpetersäure ins Probengefäß kommt es zu einer Denaturierung und zur Aggregation der Proteine, was zu einer Probenheterogenität führt. Dabei ist nicht die Aggregation das Problem, sondern die ungleichmäßige Verteilung der Aggregate in der Probenlösung. Diese Vermutung liegt deshalb nahe, weil die Präzision der Messungen besser ausfiel, nachdem die Software dahingehend programmiert wurde, dass der Salpetersäurezusatz erst im Graphitrohr durch den Autosampler zur Probenlösung gegeben wurde. So blieben die Proteinstruktur und damit auch die Probenhomogenität bis nach der Injektion erhalten.

Die ebenfalls im "Kochbuch" erwähnte Kontaminationsgefahr durch Eisen aus Staubpartikeln bzw. der Laborluft konnte nur bedingt nachvollzogen werden. Zwar ist der Raumstaub stark eisenhaltig und die Probengefäße offen, aber Sedimentationsplatten zeigten, dass selbst nach mehreren Tagen nur wenig Staub im Bereich des Autosamplers sedimentierte, was auch in dem für das Betreiben des Atomspektrometers notwendigen Abzug fußt, welcher permanent abzieht. Außerhalb des Autosamplers wurden die Proben in geschlossenen Behältnissen bewahrt und während der Aufenthaltsdauer im Autosampler wurden die Proben durch eine Abdeckung zusätzlich geschützt, sodass eine Kontamination durch Staub weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

6.3.3.3 Ergebnisse der Atomabsorptionsspektrometrie

Durch die Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung, die im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurden, konnten die Blindwerte der Messungen niedrig gehalten werden. Jedoch sind die notwendigen Chemikalien nicht völlig eisenfrei erhältlich, sodass die Messungen dennoch bei relativ hohen Blindwerten durchgeführt werden mussten (s. Abbildung 6.22).

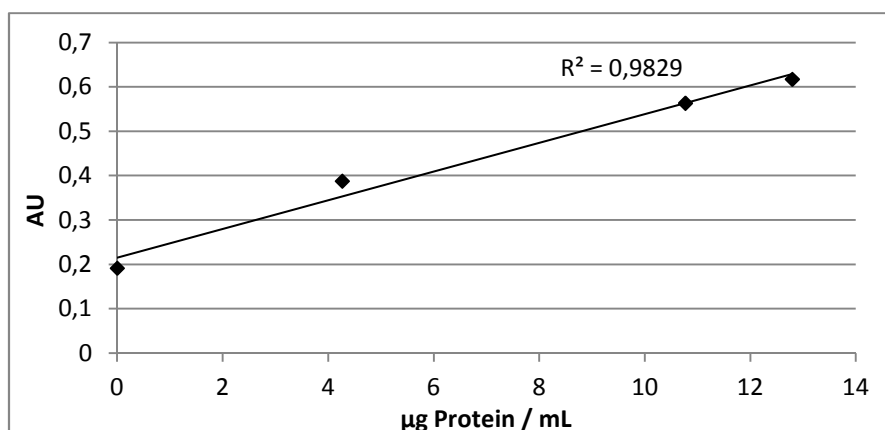


Abbildung 6.22 - Kalibriergerade für Eisen aus Myoglobin. Auf Grund von Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien hat die Bezugslösung bereits eine Absorption von 0,192 AU. Jede Lösung wurde dreimal gemessen, die Präzision lag dabei zwischen 4,2 % und 1,6 %.

Die Proben der unterschiedlichen Gerätekonfigurationen wurden wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben erhalten. Die Ergebnisse der Wiederfindungsbestimmung sind in Tabelle 6.4 zusammengefasst:

Material	Wiederfindungsrate
AAS-Vial	100 % ¹
Stainless Steel Kapillare in HPLC	99,6 %
PEEK Kapillare in HPLC	111 %
Mikroreaktionsgefäß	93,5 %
Vorsäulenfilter gebraucht	88,2 %
Vorsäulenfilter neu	82,9 %
SEC-Trennsäule 5 µm	66,3 %

Tabelle 6.4 - Wiederfindungsraten durch HR-CS-AAS Messung.¹ Der Wert für das AAS-Vial dient als Bezugswert. Die Messung unter Verwendung von PEEK-Kapillaren ergab Werte oberhalb der Kalibrierung. Es wurden jeweils unfiltrierte Lösungen verwendet, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Probenlösung war frei von sichtbaren Partikeln. Es wurden jeweils n = 3 Bestimmungen mit einer relativen Standardabweichung zwischen 1,3 - 6,7 % durchgeführt.

Die Probenlösung wurde ohne vorheriges Filtrieren untersucht, um die Probe möglichst wenig zu beeinflussen. Der geringen Lösungsgeschwindigkeit des Myoglobins in wässrigen Pufferlösungen kann mit einem nichtionischen Tensid wie Brij 35 begegnet werden. Da dieses jedoch relativ stark eisenkontaminiert ist, wurde die Probe mit Ultraschallunterstützung ge-

löst. Die Lösungsgeschwindigkeit des Proteins war für die modifizierten (niedermolaren) Puffer jedoch ohnehin besser als in den höhermolaren Pufferlösungen.

Die Untersuchung der Trennsäule fand ohne Vorsäulenfilter statt, der Wert stellt also nur die durch die stationäre Phase der Trennsäule verursachte Adsorption dar. Die Adsorption an den Vorsäulenfiltern und anderen Materialien ist jeweils individuell für sich dargestellt. Die Proben wurden unter stetiger Beobachtung des Chromatogramms an der HPLC gesammelt. Dies war vor allem für die Konfiguration mit eingebauter Trennsäule relevant, um zu bestimmen welche Fraktionen für die atomspektrometrische Untersuchung von Belang sind. Die Messung von allen 15 Fraktionen eines Chromatogramms verlangt für $n = 3$ Wiederholungen eine reine Analysendauer von etwa 2,7 Stunden. Nachdem sichergestellt wurde, dass die Fraktionen ohne ein sichtbares UV-Signal im Chromatogramm auch in der AAS nur auf Blindwertniveau liegen, wurden lediglich die auf diesem Wege als proteinhaltig identifizierten Fraktionen untersucht.

Die Wiederfindung wird relativ zur Probenlösung im AAS-Vial angegeben. Die Probenadsorption fällt hier aus den in Kapitel 6.3.3 genannten Gründen gering aus und betrifft alle Proben gleichermaßen.

Der Wert für die PEEK-Kapillare liegt trotz einer hohen Präzision der Messreihe (1,3 %) deutlich oberhalb der Konzentration der Probe- und Bezugslösung. In einer vorangegangenen Messung während der Methodenentwicklung zeigten sich bereits erhöhte Werte für diese Konfiguration. Es konnte daher nicht aufgeklärt werden, wodurch diese erhöhten Werte zustande kommen. Mögliche Erklärungsansätze sind Kontamination durch eisenhaltigen Raumluftstaub [161, S. 914], was jedoch, wie weiter oben beschrieben, bestmöglich ausgeschlossen wurde, eine Aufkonzentrierung durch Verdunstung (s. Exkurs) oder eine Ablösung von Eisenionen vom PEEK-Material, sowie Fehler bei der Fraktionierung.

Exkurs - Fehlerentstehung in der Atomabsorptionsspektrometrie:

Der Verdunstungsverlust in Laborumgebung (20 °C, 38 % RH) wurde an zwei mal zehn AAS-Vials, die mit einer salpetersauren (1 %) Reinstwasserlösung befüllt wurden, untersucht. Zehn Vials wurden unter der Abdeckhaube des Autosamplers für 28 Stunden gelagert, zehn weitere Vials wurden ohne Abdeckung direkt über dem Autosampler, jedoch im Funktionsbereich des Laborabzuges gelagert. Die Proben wurden nach 0 min, 40 min, 100 min, 3 h, 4 h, 21 h und 28 h gewogen und anschließend mittels HR-CS-AAS zur Kontrolle auf ihren Eisengehalt untersucht.

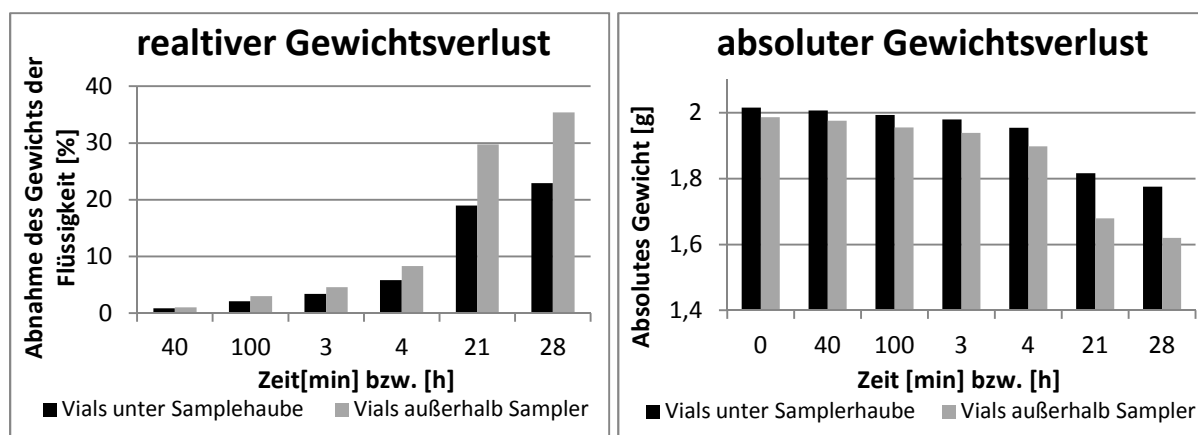


Abbildung 6.23 - Dargestellt sind die relativen und absoluten Gewichtsverluste aus den AAS-Vials durch Verdunstung unter der Abdeckung des Autosamplers (schwarz) und oberhalb dieser (grau). Ein Balken im Diagramm zeigt den Mittelwert aus zehn Vials zu den angegebenen Zeitpunkten. Man beachte die Y-Achsenkalierung des absoluten Gewichtsverlustes.

In Abbildung 6.23 sind die Ergebnisse der verdunstungsbedingten Gewichtsverluste zusammengefasst. Die AAS-Vials, die außerhalb der Autosamplerhaube gelagert wurden, zeigten höhere Gewichts- und somit Volumenverluste als die bedeckt gelagerten Gefäße. Zudem bestand hier eher die Möglichkeit der Kontamination durch eisenhaltige Staubpartikel, sodass für diese Gefäße höhere Eisensignale bei der atomspektrometrischen Untersuchung erwartet werden konnten. Da wässrige Lösungen von Eisensalzen ihren Gehalt bereits während der Herstellung stark ändern, wurde ersatzweise mit einer Myoglobinlösung kalibriert und die Werte anschließend auf reines Eisen umgerechnet.

Der relative Massenverlust durch Verdunstung lag für die bedeckten Proben zwischen 21,6 % und 26,6 % nach 28 Stunden, entsprechend einer Präzision von 6,34 % RSD. Für die unbedeckten Vials fanden sich Werte zwischen 34,1 % und 37,0 %, entsprechend einer Präzision von 2,90 % RSD.

Die atomspektrometrische Messung der bedeckt gelagerten Gefäße zeigte durchschnittlich um 19,6 % höhere Eisensignale als die Messung der unbedeckt gelagerten Gefäße. Die maximal ermittelte Konzentration betrug 11,3 ppm, jedoch bei einer Bestimmungsgrenze von 17,2 ppm. Die durchschnittliche Präzision der Messung einer Probe ($n = 3$) liegt mit 5,01 % für die unbedeckt gelagerten Gefäße und mit 4,82 % für die bedeckt gelagerten Vials im zufriedenstellenden Bereich (Systempräzision). Da die Proben jedoch alle derselben Stammlösung entnommen und in Folge identisch behandelt wurden, lohnt hier ein Blick auf die Präzision der Mittelwerte jeweils aller 10 Vials (Methodenpräzision). Diese fällt für die bedeckten Gefäße mit 9,24 % und für die unbedeckten Proben mit 31,4 % vergleichsweise hoch aus.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass keine nennenswerte Kontamination durch eisenhaltige Staubpartikel im Arbeitsbereich des Abzuges vorliegt. Die atomspektrometrischen Messungen liegen für alle Proben auf Blindwertniveau. Trotzdem sollte eine Kontamination während der Probenvorbereitung so gut wie möglich unterbunden werden. Außerdem sollten die Reagenzien für diese Messungen entsprechend gelagert und verwendet werden. Die Präzision dieser Untersuchung zeigt sich abhängig von der Probenvorbereitung, während die Gerätepräzision auf Blindwertniveau gute Ergebnisse erzielt. Als Grund

hierfür ist die nicht auszuschließende Adsorption von Eisen an den Gefäßwänden der verwendeten Materialien anzuführen [161, S. 914]. Im Bereich der Nachweisgrenze wirken sich bereits geringe Effekte stark auf die erzielte Methodenpräzision aus. Der Volumenverlust der wässrigen Proben aus den Vials vermag bei höher konzentrierten Proben zu falsch hohen Ergebnissen zu führen. So erfolgte nach 3 Stunden im Autosampler ohne Abdeckung eine Aufkonzentrierung der Probe um bis zu 5,0 %. Dies zeigt auch den Einfluss der Probenvorbehandlung, einschließlich der Standzeit im Autosampler bei einer Sequenz mit üblichem Probenumfang, auf das Messergebnis. Die Streuung während der Vorbehandlung pflanzt sich durch die geräteabhängige Streuung weiter fort.

Eindeutiger als bei den Kapillaren fällt der Unterschied zwischen neuen und gebrauchten Vorsäulenfiltern aus. Die Ursache hierfür liegt wohl in der Passivierung des Filtermaterials durch irreversible Adsorption von diversen Proteinen oder Fragmenten dieser, welche verhindern, dass sich noch weiteres Protein anlagert. Da durch die gebrauchten Filter auch diverse andere proteinhaltige Lösungen gelaufen sind, ist dies wahrscheinlich. BSA wird häufig zur Oberflächenpassivierung während der PCR eingesetzt [162, S. 79, 163]. Ähnliche Effekte beobachtet man bei ersten Probeninjektionen nach durchgeführtem Reinigungsprogramm, welches zur Regeneration von Trennsäulen verwendet wird (s. Kapitel 9.2). Bei längerer Verwendung desselben Vorsäulenfilters werden die Probenverluste sogar augenscheinlich. Trotz Sterilfiltration aller Proben kommt es zu einer sichtbaren Abscheidung größerer Mengen Myoglobin an solchen Filtern (s. Abbildung 6.24).



Abbildung 6.24 - Fotografie zweier Vorsäulenfilter. Links ein gebrauchter Filter nach mehr als 100 Injektionen unterschiedlicher proteinhaltiger Lösungen und rechts ein ungebrauchter Filter. Links gut erkennbar abgeschiedenes Myoglobin auf der Filtermembran, das mit seiner Form den eigentlich verwendeten Strömungsdurchmesser markiert. Darunter befindet sich das Filtermaterial, bestehend aus Silikagel unterschiedlicher Partikelgrößen. Die Bereiche weiter außerhalb sind zwar von Membran bedeckt, jedoch befindet sich dahinter kein Filtermaterial.

Durch das Filtermaterial aus Silikagel bietet sich in den Vorsäulenfiltern eine relativ große Oberfläche, die potentielle Bindungsstellen für Proteine enthält. Das Filtermaterial der Vorsäulenfilter wird aus bei der Kristallzüchtung anfallenden ungleich großen Silikagelpartikeln

gewonnen. Für die Säulenherstellung werden möglichst gleichgroße Partikel selektiert. Zu kleine und zu große Partikel werden dann für Vorsäulenfilter verwendet. Diese haben die Aufgabe, ungelöste Probenbestandteile von der stationären Phase der Trennsäule fernzuhalten. Es handelt sich bei diesem Prozess also weniger um Adsorption als vielmehr um physikalisches Aussieben ungelöster Bestandteile. Da diese Funktion sowohl von gebrauchten als auch von neuen Filtern in gleichem Umfang erfüllt wird, ist davon auszugehen, dass lediglich maximal die Differenz von 5,3 % (s. Tabelle 6.4) durch Adsorption des Myoglobins verursacht wird. Die verwendete Trennsäule zeigt eine nochmal deutlich größere Oberfläche. Berechnet man für die Säulendimension 300 mm x 7,8 mm unter Annahme der dichtesten Kugelpackung für uniforme 5 µm große Partikel die gesamte äußere Oberfläche der Partikel (ohne die Porosität zu berücksichtigen), kommt man bereits auf eine Oberfläche von 12,73 m² [8]. Erwartungsgemäß fällt die Wiederfindungsrate hierfür am geringsten aus. Wenn man davon ausgeht, dass etwa 11 % der injizierten Proteinmenge durch physikalisches Aussieben abgeschieden werden, so werden weitere 22 % auf der Trennsäule adsorptiv abgeschieden. Die Trennsäule erfährt durch diesen Prozess keine relevante Beeinträchtigung, da zum einen wahrscheinlich ein Großteil der Proteine verzögert eluiert wird und zum anderen die Fläche, welche von einem adsorbierten Proteinmolekül wie Myoglobin eingenommen wird, lediglich 34 nm² beträgt [164, 165]. Unter der theoretischen Annahme, dass eine vollständige Adsorption stattfinden würde, ergibt sich bei einer injizierten Menge von 60 µg Myoglobin eine Fläche von 0,073 m². Trotz der nachweisbaren Beeinflussung der Probe durch Adsorption auf der stationären Phase, wird also die Trennleistung und die Präzision der Größenausschusschromatographie nicht berührt. Daher erhält man mit dieser Trenntechnik die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellte hohe Präzision bei gleichzeitig geringer Wiederfindungsrate.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Einflussfaktoren auf die Ergebnisse von analytischen Untersuchungen von Arzneistoffen betrachtet. Die Richtigkeit analytischer Verfahren spielt eine zentrale Rolle für die Sicherheit von Arzneimitteln. Bei Beeinflussung der Analytik kommt es in Folge von Artefakten und fehlerhafter Datengewinnung früher oder später zu einer unbemerkten Beeinflussung der Qualität des Arzneimittels, was wiederum eine Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier darstellt.

Die Vorbereitung der Proben für eine analytische Untersuchung sollte dabei kritisch betrachtet und hinterfragt werden. Beeinflussungen des chromatographischen Profils der zu untersuchenden Substanz können bereits durch das Aliquotieren und Einfrieren dieser entstehen. Es wurde im Verlauf dieser Arbeit gezeigt, dass das Ausmaß der Beeinflussung der Probe von vielerlei Faktoren wie dem pH-Wert der Lösung, der Pufferkonzentration, der Temperatur bzw. Einfriergeschwindigkeit, von verwendeten (probenberührenden) Materialien, aber auch maßgeblich von den Eigenschaften des Analyten selbst abhängig und daher schwer vorhersehbar ist. Die Beeinflussung verschiedener Aliquote kann unterschiedlich stark ausfallen und zu inkonsistenten Ergebnissen führen, obwohl es sich um Proben aus derselben Stammlösung handelt. Flüssige Proben, die Proteine ohne eine Zellmatrix enthalten, sollten im Gefrierfach bei -8 °C bis -20 °C gelagert werden. Dies ist gegenüber der aufwendigen Stickstoffschockfrierung auf Grund der dabei entstehenden großen Oberflächen zu bevorzugen. Das standardmäßig eingesetzte Sterilfiltrieren von Probenlösungen vor Messung in der HPLC ist ein sinnvoller Schritt, um Säule und Gerät vor ungelösten Probenbestandteilen und Mikroorganismen bzw. Pilzsporen zu schützen, kann aber auch zu messbaren Adsorptionseffekten führen. Es empfiehlt sich daher, Material und Hersteller für alle probenberührenden Materialien gut zu wählen und diesen, wenn möglich, treu zu bleiben. Als weniger kritisch hat sich die Ultraschallbehandlung von proteinhaltigen Lösungen herausgestellt. Die Anwendung von Ultraschall beschleunigt das Lösen von Proben und vermag gleichzeitig die Lösung von gelösten Gasen zu befreien. Letzteres sollte für die Eluenten von Messreihen, die länger als 10 Stunden dauern, ggf. zwischenzeitlich wiederholt werden.

Versuche zur Proteinadsorption an verschiedenen Bauteilen und Materialien einer HPLC-Anlage und Größenausschlussäulen mittels UV-Detektion und hochauflösender Atomspektrometrie zeigten den Einfluss des chromatographischen Vorganges an sich auf proteinhaltige

Proben. Große Oberflächen verursachen hier erhöhte Adsorption. So zeigte die Injektion auf die untersuchte Größenausschlusssäule, deren Partikel eine äußere Oberfläche von 12,73 m² aufweist, eine Wiederfindungsrate von 66,3 %, während der Austausch der *Stainless Steel* Kapillare gegen PEEK-Kapillare wegen der vergleichsweise geringen Oberflächen (183 mm² bis 1193 mm²) nachweisbare, aber nur geringe Effekte zeigt. Für die stark lipophilen PEEK-Bauteile wurde hierbei eine verstärkte Proteinadsorption bei hohen Ionenstärken gezeigt, was auf ein erhöhtes *charge shielding* zurückgeht, während auf hydrophilem Stahl bzw. Silica Proteine stärker bei geringen Ionenstärken im Medium, wie es im mSEC-Modus der Fall ist, adsorbieren.

Die Verwendung atomspektrometrischer Methoden bietet die Option auf orthogonal erstellte Ergebnisse in guter Ergänzung zur HPLC. Hierzu sind Metalloproteine nötig. Die Bestimmung von Eisen erwies sich als kontaminationsanfällig und dadurch komplizierter als es für diese extrem selektive Technik üblich ist. Die Untersuchung weniger ubiquitärer Metalle sollte deutlich reibungsloser funktionieren. Daher bietet die HR-CS-AAS viel Raum für weitere Untersuchungen. Bei der Wahl des Eluenten sollte auf adäquate Pufferlösungen und Ionenstärken geachtet werden. Die Beurteilung der Ergebnisse muss unter Berücksichtigung der sich ändernden Adsorptionseigenschaften bei Veränderung der Eigenschaften des Eluenten stattfinden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem die Untersuchung einer halbfesten Zubereitung, welche die Wirkstoffe Metronidazol und Erythromycin enthielt, durchgeführt. Diese Wirkstoffkombination stellt eine häufig angewandte Therapieoption in der Behandlung der *Rosacea* dar. Die Stabilität und Qualität wurden in Abhängigkeit von der Zubereitungsgrundlage, eingesetzten Konservierungsmitteln, Herstellungsmethoden und Lagertemperaturen untersucht. Als besonders kritisch ist dabei das Kristallwachstum der Wirkstoffe zu sehen, welches mittels Grindometer und Polarisationsmikroskop beobachtet wurde. Durch die Entstehung großer ungelöster Wirkstoffpartikel wird der wirksame Anteil des Wirkstoffes in der Zubereitung gesenkt. Flüssigchromatographisch war diese verminderte Wirksamkeit nicht feststellbar, da die Partikel während der Probenvorbereitung gelöst werden mussten. Die flüssigchromatographische Untersuchung nach flüssig-flüssig-Extraktion gab jedoch Aufschluss über die hydrolytische Stabilität bzw. den Gesamtgehalt der Wirkstoffe und auftauchender Abbauprodukte. Bei Stabilitätsuntersuchungen mittels HPLC erwies sich Metronidazol als der

stabilere von beiden Wirkstoffen. Nach 8 Wochen zeigte sich in allen Zubereitungen mehr als 82 % der eingesetzten Ausgangsmenge, während der Erythromycingehalt in einer der untersuchten Zubereitungen auf 55 % absank. Die uns zur Verfügung gestellte HPLC-Methode für diese Untersuchungen konnte auf eine monolithische RP18e-Phase transferiert werden. Die Kopplung zweier Trennsäulen führte zu einer ausreichend hohen Trennstufenzahl um innerhalb von elf Minuten eine Trennung der Wirkstoffe, Hydrolyseprodukte und Begleitstoffe zu erzielen. Durch die Verwendung eines Monolithen der zweiten Generation (HR-Monolith) konnte, auch ohne die Komplikation eines Methodentransfers und ohne Kopplung mehrerer Trennsäulen zur Erhöhung der Trenneffizienz, diese Trennung erzielt werden. Durch einen gezielten Flussraten- und Elutionskraftgradienten, verkürzte sich die Analysenzeit auf nur sieben Minuten bei gleichzeitig verbesserter Trennleistung der Methode. Die viel diskutierte Entstehung von Nitrosaminen in dieser Zubereitung ist, unter den Bedingungen wie sie in einer halbfesten Zubereitung vorliegen, in der Theorie als unwahrscheinlich anzusehen. Die Menge, die pro Dosis verabreicht wird und die hohe beobachtete Stabilität des Metronidazols bedeuten ein vernachlässigbares Gefahrenpotential dieser Wirkstoffkombination in Hinsicht auf die Genese potenzieller Karzinogene, auch bei nicht idealer Komposition der Zubereitungsgrundlage. Dennoch zeigt die standardisierte Rezeptur laut NRF die höchste Stabilität für beide Wirkstoffe und sollte daher bevorzugt werden. Die Lagerung im Kühlschrank empfiehlt sich nur, wenn die Kühlung nicht längere Zeit unterbrochen wird, da ein Temperaturwechsel zu erhöhtem Kristallwachstum und somit zu einer verminderten Wirksamkeit führt.

8 Experimenteller Teil

8.1 HPLC-Geräte

Die HPLC-Untersuchungen wurden an unterschiedlichen Geräten desselben Typs durchgeführt. Es handelte sich dabei um ein Elite LaChrom HPLC-System von VWR, Darmstadt. Die Geräte unterschieden sich in erster Linie durch den Detektortyp und das Vorhandensein eines internen Degassers. Über einen Säulenofen verfügte keines der Geräte. Es wurde hierzu, wenn notwendig, ein externer Ofen verwendet:

Säulenofen T1 von TechLab (Braunschweig).

Die HPLC Anlagen waren aus folgenden Bausteinen zusammengesetzt:

- Schnittstelle (Interface): Organizer
- Detektor: L-2400 (UV/VIs) bzw. L-2455 (Dioden-Array-Detektor)
- Autosampler: L-2200
- Pumpe: L-2130 mit bzw. ohne Degasser

Bei Arbeiten, die an Anlagen ohne Degasser durchgeführt wurden, wurden Proben und Eluenten vor der Analyse mittels Ultraschallbad oder im Vakuum entgast.

Die Steuersoftware war dieselbe wie zum Auswerten der Chromatogramme: EZChrom Software Version 3.2.1.

Die weitere Auswertung und die Erzeugung von Diagrammen erfolgten mit Microsoft Excel in den Versionen 2003 und 2007.

8.1.1 Modifikationen am Gerät

Für die Untersuchungen zur Adsorption wurden Teile der Leitungen am Autosampler ersetzt. Diese bestehen bei Auslieferung aus rostfreiem Edelstahl (*Stainless Steel*, SS) und wurden durch Kapillaren aus Polyetheretherketon (PEEK) ersetzt.

Werkseitig	Ersatzteil aus PEEK ¹
Probenschleife 100 µL	0,254 mm Innendurchmesser (ID) *1520 mm (blau)
Verbindung Injektionsport - oberes Mehrwegeventil (Totvolumen)	0,1016 mm ID * 1520 mm (schwarz)
Verbindung Schaltventil - Säule	0,130 mm ID x 450 mm (rot)
HPLC-Säule	0,0635 mm ID * 1520 mm (braun)
SS-Connectoren	PEEK-Fittings mit 10-32 Gewinde

Tabelle 8.1 verwendete Bauteile in der HPLC. ¹ Die PEEK-Kapillaren wurden von Upchurch Scientific (IDEX Health & Service in Wertheim-Mondfeld) produziert und werden in beliebigen Längen vertrieben. Die PEEK-Fittings stammen von VICI-Jour (Schenk, Schweiz).

8.1.2 Filtermaterialien

Für das Filtrieren der flüssigchromatographisch untersuchten Proben wurden Sterilfilter mit der Porengröße 0,22 µm verwendet.

Der für die Proteinversuche verwendete Filtertyp ist der PVDF-Filter der Firma Roth. Für die Versuche mit *Small Molecules* wurden die CME-Filter der Firma Roth verwendet. Für die Filtrationsversuche wurden außerdem zwei Filter eines anderen Herstellers getestet. Alle verwendeten Filtermaterialien sind hier im Folgenden aufgelistet:

Carl Roth (Karlsruhe):

- Cellulosemischester (CME)
25 mm Ø
150 µg Protein/cm²
- Polyvinylidendifluorid (PVDF)
25 mm Ø
4 µg Protein/cm²

BGB-Analytik (Rheinfelden):

- CME
25 mm Ø
150 µg Protein/cm²
- PVDF
25mm Ø
4 µg Protein/cm²

8.1.3 Umkehrphasen-Säulen

Es wurden sowohl partikuläre als auch monolithische Säulen verwendet. Beide wurden ausschließlich von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen:

- LiChrospher 100
Stationäre Phase Modifizierung: RP18
5 µm sphärische Kieselgelpartikel
124 * 4 mm
- Chromolith Performance
Stationäre Phase Modifizierung: RP18 endcapped
100 * 4,6 mm
- Chromolith HighResolution (Research Sample)
Stationäre Phase Modifizierung: RP18 endcapped
100 * 4,6 mm

Das Koppeln der monolithischen Säulen wurde möglich durch einen Säulenkoppler mit der Bezeichnung: *"One-piece column coupler for Chromolith columns with 10-32 female ports"* der Firma Merck.

Die Säulen wurden nach jeder Benutzung von Puffersalzen durch Spülen mit 20 mL Wasser befreit und dann mit mindestens 30 mL 90 % Acetonitril auf die Lagerung vorbereitet. Der 10 %ige Wasserzusatz verhindert die Polymerisierung von Acetonitril, welche bei längerem Nichtgebrauch zu erhöhten Rückdrücken führen und so das Säulenleben verkürzen kann.

8.1.3.1 Hausinterner Systemtest für HPLCs

Der hausinterne Systemtest überprüft zentrale Leistungsparameter einer HPLC-Anlage. Hierzu zählen die Injektor bzw. Detektorlinearität, Flussratenpräzision, statisches und dynamisches Rauschen und Drift des Detektors.

Säule	LiChrospher 100 Stationäre Phase Modifizierung: RP18 5 µm sphärische Kieselgel Partikel 124 * 4 mm		
Wellenlänge	207 nm		
Laufzeit	14 min		
Fließmittel	17,5 % Acetonitril 82,5 % bidest. Wasser Mit H ₃ PO ₄ auf pH 2,5 eingestellt		
Lösemittel Probe	Fließmittel		
Flussrate	1,5 mL/min		
Substanzlösung	Testsubstanzen	t _R [min]	Einwaage [mg]
	Benzoessäure	7,6	180
	Acetanilid	4,4	100
	Salicylsäure	9,9	100
	Coffein	1,9	70
	Paracetamol	1,3	100

Tabelle 8.1 - Methode zum hausinternen HPLC-Systemtest. Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Substanzlösung und alle relevanten Geräteparameter. Diese gelten, soweit nicht abweichend davon im Text beschrieben. t_R ist die Retentionszeit in Minuten.

Unmittelbar vor einer Messung, soweit eine Injektion vorgenommen wurde, wurde die Substanzlösung mit Fließmittel im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Zur Bestimmung der Präzision wurden 3 Probenvials verwendet. Jedes wurde mit derselben Probenlösung befüllt. Aus jedem Vial wurden 10 Injektionen durchgeführt und die Präzision der Peakflächen sowie der Retentionszeiten aller Stoffe aus diesen 10 Injektionen bestimmt.

Voraussetzung hierfür ist die Basislinientrennung aller Signale im Chromatogramm. Dies stellte jedoch bei keiner der durchgeführten Qualifizierungen je ein Problem dar. Für alle Stoffe überstieg die Präzision der Retentionszeiten nur in Ausnahmefällen 0,5 % und die der Signalflächen lag nur in seltenen Ausnahmefällen über 1,0 %. Auffällig häufig war eine Retentionszeit- und Flächenabweichung bei der ersten Injektion für Salicylsäure zu beobachten. Die Elution erfolgte verzögert und ergab höhere Signale. Dieses Verhalten konnte nicht nachvollzogen werden. Dabei sollte die erste Injektion in einer Sequenz, vor allem bei verlängerter Retention, doch gerade geringere Signalflächen aufweisen. Die Integration der Signale funktioniert über eine automatische Signalerkennung. Sobald der Wert der Steigung einen gewissen Grenzwert überschreitet, wird von der Software der Kurvenverlauf als Signal (Peak) registriert. Bei einer verstärkten Retention kommt es, vor allem bei ohnehin hohen Retentionszeiten, zu einer Peakverbreiterung die unweigerlich mit einer schwächeren Steigung zum Beginn des Signales einhergeht. Die Folge ist, dass der Peak nicht vollständig erkannt wird. Da dieses Verhalten nur für Salicylsäure und nur bei der ersten Injektion beobachtet wurde, bestand kein Anlass zum Verwerfen der Qualifizierung.

Zur Bestimmung der Injektionslinearität wurde dieselbe Probenlösung verwendet. Zusätzlich zur 1:10 Verdünnung der Substanzlösung wurde eine 1:20 Verdünnung hergestellt. Es wurde dann eine Sequenz mit jeweils 5 Injektionen steigender Volumina von 1 µL, 10 µL, 20 µL, 30 µL und 50 µL beider Verdünnungen durchgeführt. Anschließend wurde die Präzision von Signalflächen und Retentionszeiten ermittelt, sowie die Linearität anhand von Kontrollkarten und dem Korrelationskoeffizienten (R^2) überprüft. Dabei sollte sich eine Korrelation der Mittelwerte von jeweils 5 Injektionen aller Volumina von $R^2 > 0,99$ ergeben.

Zur Bestimmung der Flussratengenauigkeit wurde bidestilliertes Wasser direkt in ein auf einer Laborwaage befindliches Becherglas eluiert und darüber das Volumen ermittelt. Dies wurde für die Flussraten 1,0 mL/min, 2,0 mL/min und 2,5 mL/min durchgeführt. Da der Einfluss der händischen Fraktionierung mit zunehmender Flussrate steigt, ergeben sich für höhere Flussraten unvermeidbar höhere Fehler. Bei Geräten mit neuen Pumpenkopfdichtungen ergaben sich unabhängig vom Gerätealter, Abweichungen zwischen 2 % (1 mL/min) und 8 % (2,5 mL/min). Bei einer Anlage, die später für untauglich erklärt wurde, zeigten sich Schwankungen von 4 % (1 mL/min) bis 20 % (2,5 mL/min).

Der Detektordrift wurde statisch (Flussrate = 0 mL/min) und dynamisch (1,0 mL/min) ermittelt, indem bei dem oben angegebenen Fließmittel für 10 Minuten ein Chromatogramm aufgezeichnet wurde, ohne dass eine Injektion erfolgte. Dann wurde die Differenz des Detektor-Response in *Absorption Units* (AU) über diese Zeit bestimmt. Der statische Drift fiel dabei häufig stärker aus als der dynamische. Dies liegt wohl an der Erwärmung des Detektorfensters. Bei zunehmender Temperatur sinkt dadurch die Absorption.

Die Beurteilung des Rauschens erfolgte, um den Drift nicht zu berücksichtigen, unter graphischer Auswertung. Für jeweils eine Minute wurde der minimale und der maximale Ausschlag der Basislinie ermittelt und der Betrag dieser Differenz notiert. Von zehn auf diese Weise ermittelten Werten wurde der Mittelwert gebildet. Es wurden nur Grenzwerte für die dynamischen Bestimmungen festgelegt. Die Grenzwerte für den dynamischen Drift betrugen $5 \cdot 10^{-3}$ AU und für das dynamische Rauschen $2 \cdot 10^{-5}$ AU. Mit zunehmendem Lampenalter verstärkt sich das Rauschen und der Drift. Jedoch können die Grenzen deutlich länger eingehalten werden als es die Gerätehersteller für die Lebensdauer der Strahlungsquellen vorsehen.

8.1.3.2 Methoden

Die Analyse der halbfesten Zubereitungen aus Kapitel 5 wurde basierend auf einer Methode erstellt, welche uns freundlicherweise vom Zentrallabor Deutscher Apotheker (ZL) zur Verfügung gestellt wurde. Diese wurde im Nachhinein unter Verwendung einer Chromolith HighResolution Säule erneut optimiert.

	Ursprüngliche Methode	Methode nach Transfer	Optimierung durch HR-Monolithen
Säule	Eurospher RP-18 5 µm partikulär 250 * 4 mm	2 * Chromolith RP18 Je 100 * 4,6 mm	Chromolith HR RP-18 100 * 4,6 mm
Wellenlänge	200 nm	200 nm	200 nm
Laufzeit	30 min	11 min	7 min
Fließmittel	70% KH ₂ PO ₄ 0,02 M pH 3 30 % Acetonitril	70% KH ₂ PO ₄ 0,02 M pH 7 30 % Acetonitril	0-2,8 min 60 % A ¹ 0,8 mL/min 3,2-6,0 min 100 % A ¹ 5 mL/min 7,0-9,0 min 60 % A ¹ 1,2 mL/min
Lösemittel Probe	40 % Acetonitril	80% KH ₂ PO ₄ 0,02 M pH 7 20 % Acetonitril	KH ₂ PO ₄ 0,02 M pH 7

Flussrate		1 mL/min	2 mL/min	0,8 - 5 mL/min
t_R	Erythromycin	11,5 - 13 min ²	3,1 min	5,0 min
	Metronidazol	3,5 min	1,7 min	3,3 min

Tabelle 8.2 - Chromatographische Methodenparameter zur Trennung von Metronidazol und Erythromycin aus einer halbfesten Zubereitung. 1) Eluent A: 30 % Acetonitril + 70 % Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 7,0, 0,02 mol/L; Eluent B: Kaliumhydrogenphosphatpuffer pH 7,0, 0,02 mol/L.

2) Anfangs bei 11,5 min. Später stabilisierte sich diese Retentionszeit bei 13 min.

8.1.4 SEC-Säulen und Vorsäulen

Es wurden zwei Größenausschlusssäulen desselben Herstellers, Phenomenex (USA) in dieser Arbeit verwendet:

Hersteller und Säulenbezeichnung	Phenomenex Biosep® SEC S3000	Phenomenex Yarra® SEC 2000
Dimensionen	300 * 7,8 mm	300 * 7,8 mm
Partikeltyp	5 µm sphärische Kieselgelpartikel	3 µm sphärische Kieselgelpartikel
Stationäre Phase Material	Kieselgel	Kieselgel

Tabelle 8.3 - Tabellarische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten SEC-Säulen.

Zum Schutz der Säule wurde der vom Hersteller empfohlene *Security-Guard* (Vorsäule) verwendet. Dieser besteht aus einer Kartusche mit wechselbaren Patronen. Diese enthalten die bei der Züchtung von sphärischen Kieselgelpartikeln anfallenden Partikel, welche von der gewünschten Größe und Form abweichen.

Nach der Benutzung wurden die Säulen durch Spülen mit 60 mL vollentionisiertem Wasser von Puffersalzen befreit und dann durch Spülen mit mindestens 60 mL einer 0,05 % NaN_3 -Lösung auf die Lagerung vorbereitet. Diese unterdrückt mikrobielles Wachstum und so die Zerstörung der Säule hierdurch.

8.1.4.1 Methoden

Für die Experimente zur Größenausschlusschromatographie wurden grundsätzlich zwei unterschiedliche Verfahren verwendet, welche sich durch die verwendete Ionenstärke des Eluenten unterscheiden. In der mSEC wird die Ionenstärke soweit abgesenkt, dass eine Interaktion der Probenmoleküle mit der stationären Phase möglich wird. Bei der SEC wird die Ionenstärke höher gewählt um die Interaktionen zu vermeiden. Die pH-Werte der Eluenten wurden mittels Glaselektrode überprüft und $\pm 0,01$ pH-Einheiten eingestellt. Die Proteine

wurden so eingewogen, dass sich eine Massenkonzentration von 1 mg/mL ergab. Der Antikörper wurde nach Aliquotierung aus einer Bulklösung (10 mg/mL) 1:5 verdünnt. Diese Lösung diente dann als Probenlösung.

8.1.4.1.1 mSEC

Sofern im Ergebnisteil nicht explizit anders angegeben, wurde für die Versuche im modifizierten Größenausschlussmodus die Mobile Phase wie folgt hergestellt. Dieser Eluent geht auf die Arbeit von Kopaciewicz et al. zurück [113] und wurde auch von Kaminski [7] und Grotefend [166] verwendet:

2,181 g KH_2PO_4

0,992 g Na_2HPO_4

8,2 g NaCl

H_3PO_4 zur pH- Werteinstellung

ad 1000 mL vollentionisiertes Wasser

Diese Lösung wurde vor der Verwendung 1:10 mit vollentionisiertem Wasser verdünnt und dann verwendet.

Für die HR-CS-AAS-Versuche wurde ein phosphatfreier Eluent entwickelt. Dieser wurde mit Kaliumchlorid und MES hergestellt. Die Herstellung wurde so durchgeführt, dass sich bei pH 6,8 eine Ionenstärke des Eluenten von 17,7 mM einstellt:

1,952 g MES

0,5848 g KCl

ad 1000 mL bidestilliertes Wasser

NaOH zur pH- Werteinstellung

Als Lösemittel für die Proben wurde mobile Phase verwendet.

Zur Reinigung und Oberflächenäquilibrierung der Säulen wurde ein Spülprogramm aus mehreren Eluenten vollzogen:

30 mL Phosphatpuffer pH 3; 20 mM

30 mL Wasser

Acetonitrilgradient 0 % - 90 % und 90 % - 0 % über 30 Minuten

30 mL 0,5 % Natriumdodecylsulfatlösung

30 mL Wasser

8.1.4.1.2 iSEC

Die mobile Phase für den normalen SEC-Modus wurde von Kaminski übernommen. Diese Methode lehnte sich an die Arzneibuchmonographie für Phosphatpufferlösung pH 6,6 R an [167, S. 6766]:

6,80419 g KH_2PO_4

0,711448 g NaOH

17,5329 g NaCl

ad 1000 mL vollentionisiertes Wasser

8.1.5 Chemikalien und Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien bzw. Proteine und Lösemittel und die Firmen von denen diese bezogen wurden, sind im Folgenden tabellarisch dargestellt:

Merck KGaA, Darmstadt	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) p.a.
	Dinatriummonohydrogenphosphat (Na_2HPO_4) p.a.
	Phosphorsäure (H_3PO_4) p.a.
	Natriumchlorid (NaCl) p.a.
	Natriumhydroxid (NaOH)
	Acetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) p.a.
	Methanol (CH_3OH) p.a.
	Salpetersäure 65 % (HNO_3) p.a.
VWR Chemicals, Darmstadt	Acetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) <i>super gradient grade</i>
Sigma Aldrich Chemie, Steinheim	Dikaliummonohydrogenphosphat (K_2HPO_4)
	Kaliumchlorid (KCl) für Zellkultur
	Triton X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$)
	Myoglobin >90 % (Pferdeherz)
	Ovalbumin (Hühnereiweiß)
	BSA >98 % (Rind)
	Thyreoglobulin >90 % (Rinderschilddrüse)

	γ -Globulin >97 % (Rind)
Carl-Roth, Karlsruhe	MES ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$)
	Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) >99,5 % Ph.Eur., reinst
Caesar&Lorenz, Hilden	Erythromycin, mikronisiert
	Metronidazol, mikronisiert
	Basiscreme DAC
	Hydrophile Salbe

Tabelle 8.2 -Verwendete Chemikalien und Proteine sowie Bezugsquelle bzw. Hersteller. Wo möglich wurde die Qualität mit angegeben (p.a. = pro analysi).

Bidestilliertes Wasser wurde entweder durch Destillation oder mit dem "arium pro VF|UF & DI|UV" von Sartorius (Göttingen) gewonnen.

8.2 HR-CS-AAS

Es wurde mit einer ContrAA 700 von AnalytikJena (Jena) gearbeitet. Diese ermöglicht den Betrieb im Flammen- und im Graphitrohrföfenmodus. Nur letzterer wurde in dieser Arbeit verwendet. Das Gerät arbeitet mit querbeheizten Graphitrohren (19 mm * 6 mm). Die Programmierung des Gerätes und die Auswertung der erhaltenen Daten wurde mit der Steuerungssoftware Aspect CS Version 1.5.6.0. und mit Microsoft Excel 2007 durchgeführt.

8.2.1 Methoden

Das für die Kopplungsversuche mit der HPLC zur Adsorptionsuntersuchung verwendete Ofenprogramm der HR-CS-AAS baute sich nach der Entwicklung wie folgt auf:

Schritt	Vorgang	Temperatur [°C]	Rampe [°C/s]	Haltezeit [s]	Gasfluss
1	Trocknen	90	10	45	Max
2	Trocknen	105	7	60	Max
3	Trocknen	500	50	30	Max

4	Pyrolyse	1150	200	20	Max
5	Gasanpassung	1150	0	5	Stop
6	Atomisierung	2250	1500	4	Stop
7	Ausheizen	2500	500	5.5	Max

Es wurden jeweils 5 µl injiziert und das Eisen bei der primären Wellenlänge für Eisen von 248,327 nm gemessen.

8.2.2 Chemikalien

Die für die AAS verwendeten Chemikalien entsprachen denen für die HPLC. Das für diese Versuche verwendete Myoglobin wurde vor der Einwaage im Vakuum getrocknet.

8.3 Herstellung halbfester Zubereitungen

Die halbfesten Zubereitungen wurden am Institut für pharmazeutische Technologie angefertigt und gelagert. Hierzu wurden zwei Verfahren angewandt. Zum einen die händische Herstellung mittels Fantaschale und Pistill und zum anderen die Anwendung des Sandwich-Verfahrens in einem automatischem Rührsystem (TopiTec® Automatic, WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co KG, Hilscheid)

8.4 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die elektrophoretischen Trennungen in dieser Arbeit wurden mit Unterstützung von Markus Nachbar angefertigt. Die verwendete Kapillarelektrophorese war eine PrinCE-C760 (*PrinCE Technologies*, Emmen, Niederlande) mit einem DA-Detektor. Gemessen wurde wie auch bei den entsprechenden HPLC-Versuchen, bei einer Wellenlänge von 200 nm. Alle Experimente wurden in einer 75 µm ID *bare fused silica* Kapillare mit einer absoluten Länge von 100 cm (effektiv: 92,5 cm) durchgeführt. Die Kapillare wurde von der Firma *Polymicro Technologies* aus Phoenix (USA) bezogen. Die Elektropherogramme wurden registriert und ausgewertet mit der Systemsoftware DAX3d (*Prince Technologies*, Emmen, Niederlande).

8.3.1 Methode

Der Probenextrakt aus der flüssig-flüssig Extraktion (s. Kapitel 5.3) wurde nach einer modifizierten Methode in Anlehnung an die Arbeit von Laloo et al. durchgeführt [139]. Zur Probenlösung wurde Methanol bis zu einer Konzentration von 20 % (V/V) hinzugegeben. Vergleichslösungen, welche entweder nur Metronidazol oder nur Erythromycin in der Konzentration 1 bzw. 2 mg/mL enthielten, wurden auf gleiche Weise gefertigt.

Als Trennpuffer wurde ein PBS 0,035 mol/L bei pH 7,5 mit 50 % Methanol verwendet. Die Kapillare wurde vor der Trennung mit 1 mol/L Natronlauge bei 23 °C für 40 Minuten bei 1000 mbar konditioniert. Vor jeder Trennung wurde die Kapillare jeweils für 3,5 Minuten mit 0,1 mol/L Natronlauge und Wasser bei 23 °C mit 2500 mbar sowie für 8 Minuten unter gleichen Bedingungen mit Trennpuffer gespült. Die Probe wurde elektrokinetisch, mit einer Injektionsdauer von 0,15 Minuten bei einer Spannung von 10 kV injiziert, um die Konzentration der geladenen Arzneistoffmoleküle in der Probenzone zu erhöhen. Hierdurch sollte ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis erzielt werden. Die Trennung wurde dann bei einer Spannung von 25 kV für 50 Minuten durchgeführt.

8.5 Grindometer

Das Grindometer (Hersteller nicht bekannt) diente der Bestimmung der maximalen Teilchengröße (0 – 110 µm) suspendierter Wirkstoffe. Zur Partikelgrößenbestimmung wurde eine Probe der Zubereitung mithilfe eines Rakels über die keilförmige Aussparung auf der Oberfläche des Grindometers ausgestrichen. Die Tiefe des Keils ist seitlich skaliert, sodass, wenn Partikel beim Ausstreichen vor dem Rakel hergeschoben werden wenn der Spalt die Partikelgröße unterschreitet, die Partikel Spuren in der halbfesten Zubereitung hinterlassen und so die Partikelgröße am Beginn der Spur an der Skala abgelesen werden kann. Der Beginn der Spur zeigt auf der Skala die größten vorhandenen Partikel an [168, S. 427].

8.6 Polarisationsmikroskop

Es wurde ein Leika DMLM Fotomikroskop (Fa. Leika, D-Solms) verwendet. Die Proben wurden auf dem Objektträger unter einem Deckgläschen mit 100-facher Vergrößerung untersucht. Mittels Olympus DP12-Kamera wurden die Aufnahmen der Präparate erstellt und mit der Software Olympus DP-Soft Version 3.2 bearbeitet.

8.7 Software

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden neben der Textbearbeitungs- und Kalkulationssoftware noch weitere Computerprogramme verwendet:

ChemBiodraw Ultra

Version 13.0 zur Erstellung der Strukturformeln und Reaktionsmechanismen und zur Berechnung der kalkulierten logP-Werte im Zusammenhang mit den Experimenten zu Erythromycin und Metronidazol.

paint.net

Version 4.0.6 zur Bildbearbeitung bzw. Kolorierung oder Kontrastverbesserung.

Microsoft Powerpoint 2007

Im ServicePack 3 zur Erstellung von Darstellungen und Schaubildern.

Microsoft Word 2007

Im ServicePack 3 Dieses Dokument wurde hiermit verfasst.

Microsoft Excel 2007

Im ServicePack 3 zur Auswertung erhaltener Daten, sowie zur Erstellung von Abbildungen, wie Chromatogrammen aus Rohdaten, welche mit EZChrom Elite (s. Kapitel 8.1) erhalten wurden.

Citavi

Version 5.0.0.11 zur Verwaltung der Literaturreferenzen und Erstellung des Literaturverzeichnisses.

Chimera

UCSF Chimera Version 1.10.2 wurde zur Anfertigung des Schaubildes der Myoglobinkristallstruktur in Kapitel 6.3.3 verwendet.

9 Anhang

9.1 Anhang zu Kapitel 5

Im Folgenden sind die Versuche zur Hydrolysestabilität bei unterschiedlichen pH-Werten von Metronidazol und Erythromycin dargestellt. Dabei wurden die Wirkstoffe einzeln in wässrigen Pufferlösungen bei pH 4, pH 8 (nicht dargestellt) und pH 12 gelagert. Es wurden regelmäßig Injektionen über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Ein Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus 3 aufeinanderfolgenden Injektionen (s. Abbildung 9.1, Abbildung 9.2, Abbildung 9.4, Abbildung 9.5, Abbildung 9.6, Abbildung 9.7 und Abbildung 9.8).

Erythromycin:

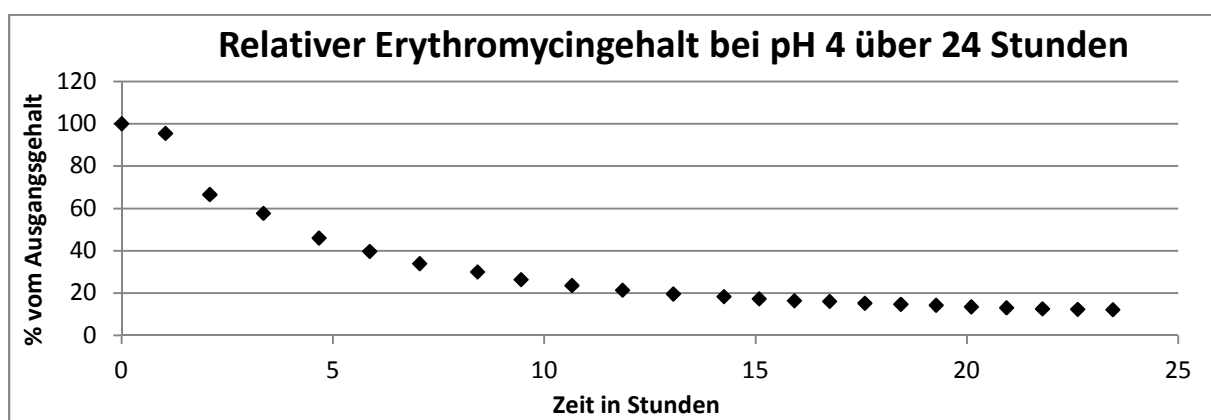


Abbildung 9.1 - Kontrollkarte über den relativen Erythromycingehalt, bezogen auf den Ausgangsgehalt einer frisch hergestellten Lösung. Nach 12 Stunden können noch etwa 20 % der Ausgangsmenge und nach 24 Stunden noch etwa 12 % der ursprünglich vorhandenen Menge an Erythromycin gefunden werden.

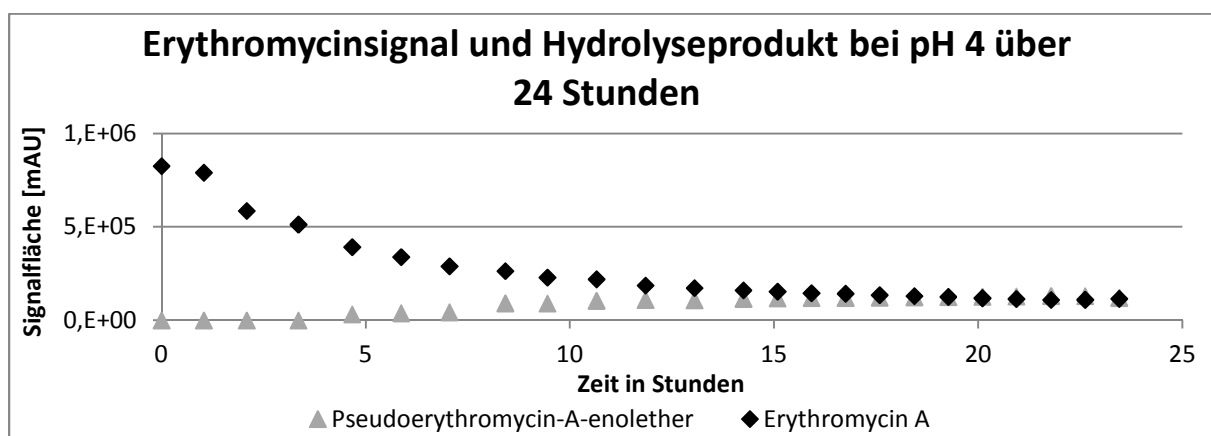


Abbildung 9.2 - Kontrollkarte über die Signalintensität, dargestellt als Peakfläche von Erythromycin und dem Abbauprodukt Pseudoerythromycin-A-enolether bei pH 4 gegen die Zeit.

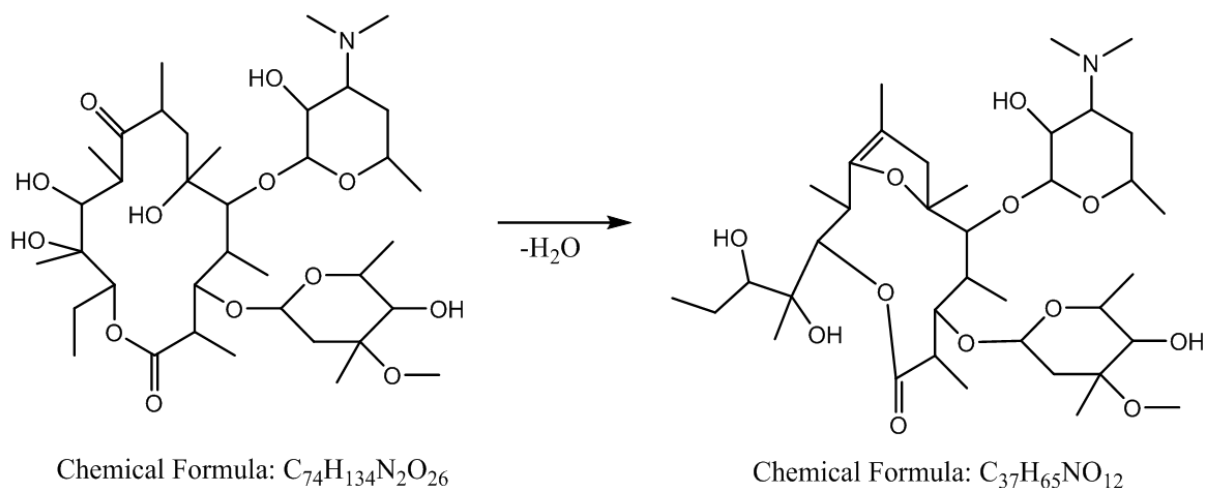


Abbildung 9.3 - Hydrolysereaktion von Erythromycin A, der Hauptwirkkomponente des Arzneistoffes Erythromycin zum am häufigsten entstehende Hydrolyseprodukt. Die Zuordnung erfolgte anhand der Retentionszeiten im Chromatogramm. Die Formeln wurden mit ChemBioDraw erstellt.

Bei höheren pH-Werten zeigten sich die Signale an den Retentionszeiten der Hydrolyseprodukte bzw. Verunreinigungen unauffällig. Der hydrolytische Abbau der Ausgangssubstanz verlief unter alkalischen Bedingungen bei pH 12 deutlich langsamer als im sauren Milieu (s. Abbildung 9.4).

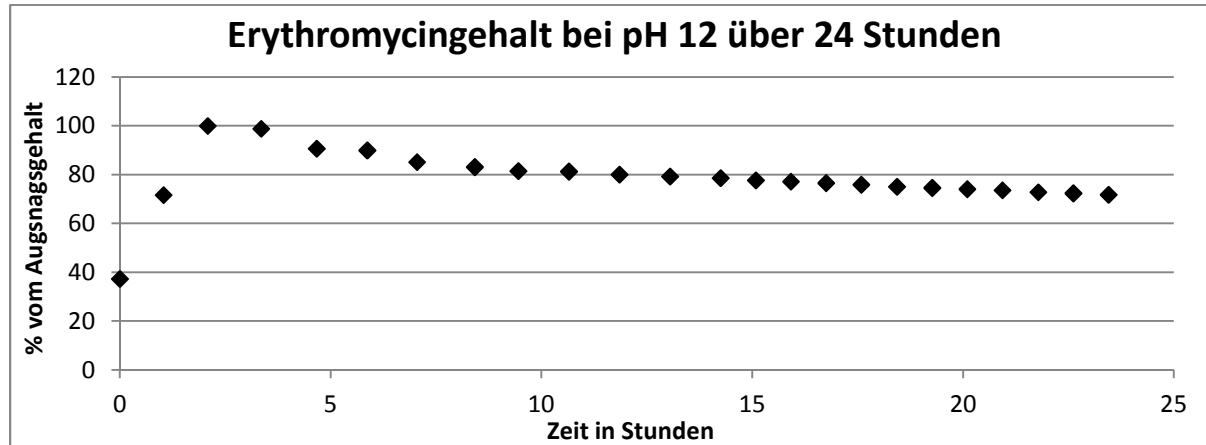


Abbildung 9.4 - Kontrollkarte über den Wirkstoffgehalt von Erythromycin relativ zum Ausgangsgehalt bei pH 12. Nach 24 Stunden konnten noch etwa 72 % der ursprünglich vorhandenen Wirkstoffmenge gefunden werden.

Die Chromatogramme zur Versuchsreihe bei pH 12 zeigen für die Substanz und die Methode ungewöhnlich hohe Retentionszeiten. Der Grund hierfür ist ein versehentlich zu hoch eingestellter Wasseranteil im Fließmittel. In der Folge wurde das Erythromycinsignal nicht vollständig aufgezeichnet, wodurch die Peakflächen geringer ausfallen. Da die Trennung hierdurch nur verzögert, jedoch nicht wesentlich beeinträchtigt wurde, war eine Erweiterung

des Detektionsfensters (also eine längere Laufzeit pro Injektion) ausreichend. Das Signal wurde dann vollständig erfasst.

Metronidazol:

Die Messungen für Metronidazol zeigten eine höhere Hydrolysestabilität gegenüber extremen pH-Werten als es für Erythromycin der Fall ist. Daher wurden die HPLC-Injektionen nach 10 Stunden vorerst unterbrochen und nach einer Reaktionszeit bzw. Hydrolysedauer von zwei Tagen bei Raumtemperatur wieder aufgenommen. Nach 10 Stunden wurde bei pH 4 ein Gehalt von 96 % bezogen auf die Ausgangsmenge gemessen (s. Abbildung 9.5). Die Fortsetzung nach über 2 Tagen (ab Stunde 64) führte schließlich zu einer Absenkung des Gehaltes auf 90 % (s. Abbildung 9.6).

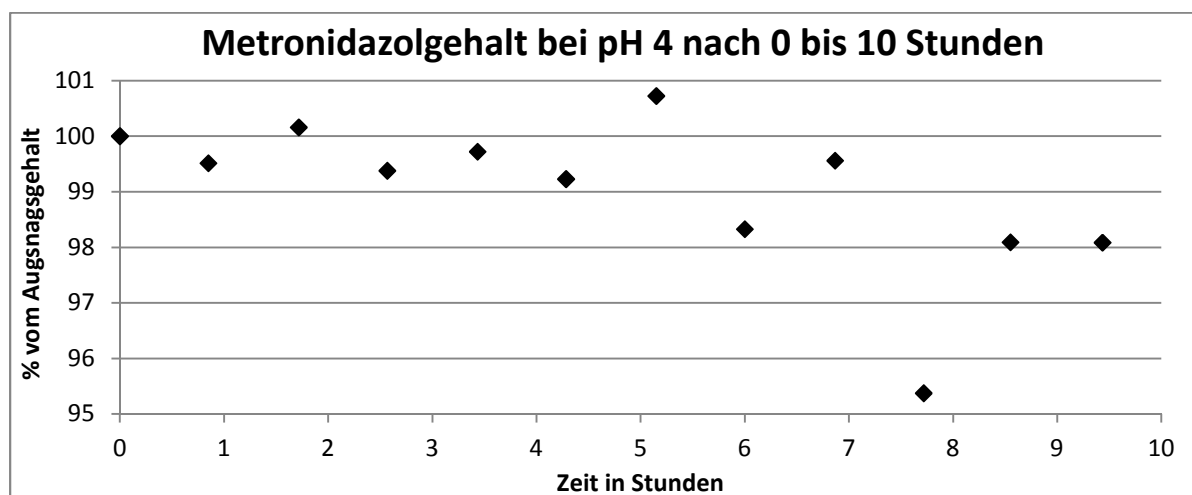


Abbildung 9.5 - Kontrollkarte über den Wirkstoffgehalt von Metronidazol relativ zum Ausgangsgehalt bei pH 4. Nach 10 Stunden konnten noch etwa 96 % der ursprünglich vorhandenen Wirkstoffmenge gefunden werden. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 3 Injektionen.

Nach 69 Stunden geschah eine plötzliche Abnahme des Gehalts um etwa 7 %. Diese kann nicht auf einen Gerätefehler zurückgeführt werden. Die Probe die untersucht wurde war über den gesamten Zeitraum dieselbe. In Abbildung 9.6 ist für jeden Punkt jeweils die zweifache Standardabweichung für jeden Punkt angezeigt. Unter Berücksichtigung dieser Streuung in dieser Sequenz ist die durchgehende Tendenz erkennbar, jedoch nicht so deutlich wie erwartet. Gut zu erkennen ist jedoch die hohe Stabilität des Metronidazols, welches nach weit mehr als 48 Stunden bei pH 4 unzersetzt vorliegt.

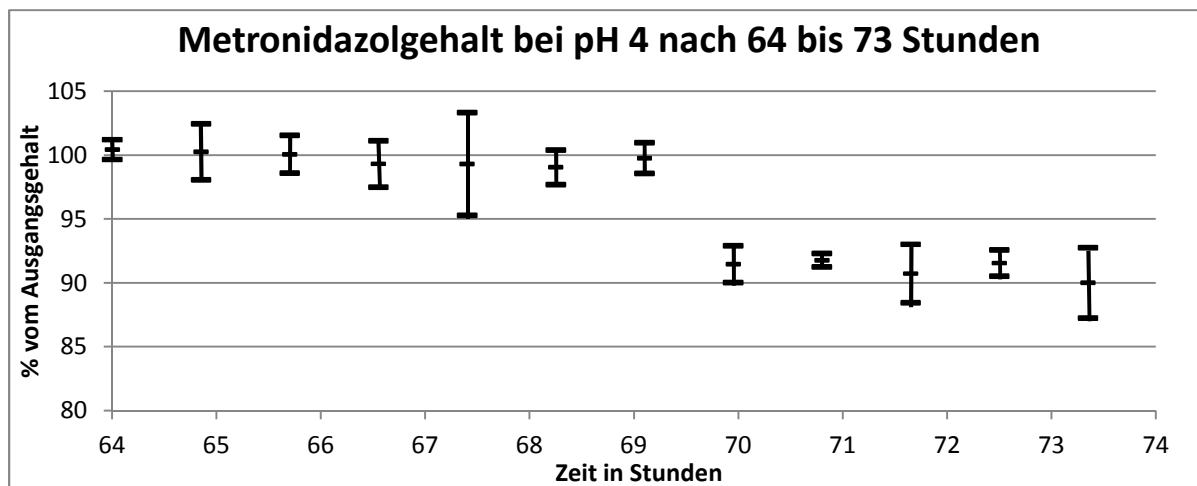


Abbildung 9.6 - Kontrollkarte über den Wirkstoffgehalt von Metronidazol relativ zum Ausgangsgehalt bei pH 4. Nach einer Unterbrechung von etwa 2 Tagen wurde die Versuchsreihe fortgesetzt. Nach gut 73 Stunden konnten noch etwa 90 % der ursprünglich vorhandenen Wirkstoffmenge gefunden werden. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 3 Injektionen. Zu jedem Punkt ist die zweifache Standardabweichung dargestellt.

Auch in einer alkalischen Lösung zeigte Metronidazol eine deutlich höhere Hydrolysestabilität als Erythromycin. Nach 10 Stunden konnten noch 96 % der ursprünglich vorhandenen Wirkstoffmenge gefunden werden (s. Abbildung 9.7). Die Wiederaufnahme der HPLC-Injektionen nach 2 Tagen zeigte eine nur unwesentliche Veränderung. Nach etwa 73 Stunden konnten noch 94 % der ursprünglich vorhandenen Menge gefunden werden (s. Abbildung 9.8).

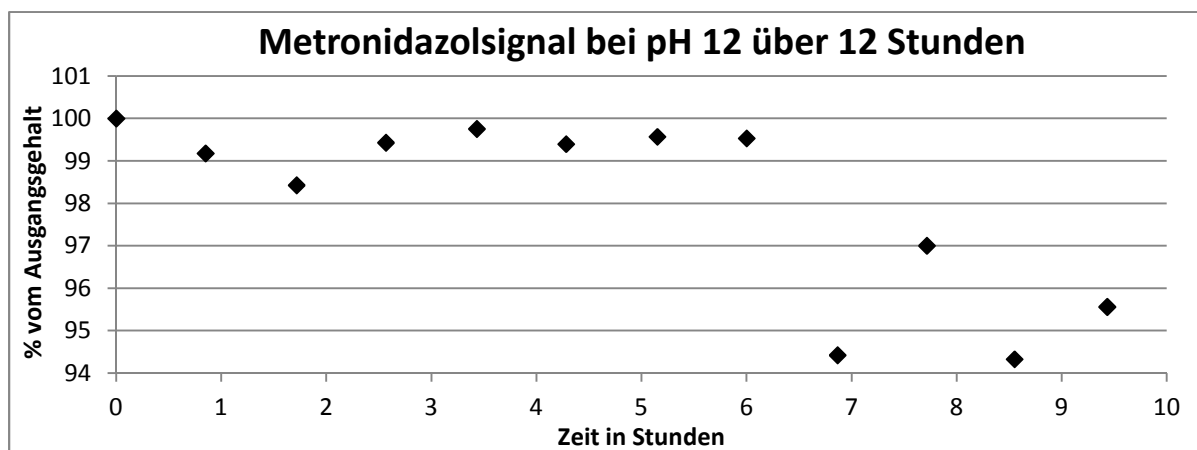


Abbildung 9.7 - Kontrollkarte über den Wirkstoffgehalt von Metronidazol relativ zum Ausgangsgehalt bei pH 12. Nach 10 Stunden konnten noch etwa 96 % der ursprünglich vorhandenen Wirkstoffmenge gefunden werden. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von 3 Injektionen.

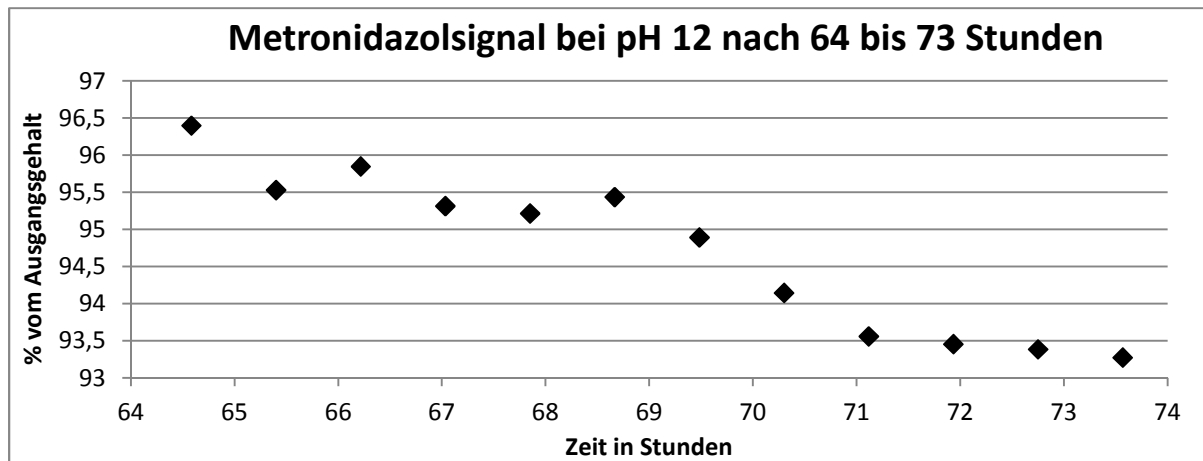


Abbildung 9.8 - Kontrollkarte über den Wirkstoffgehalt von Metronidazol relativ zum Ausgangsgehalt bei pH 12. Nach einer Unterbrechung von etwa 2 Tagen wurde die Versuchsreihe fortgesetzt. Nach gut 73 Stunden konnten noch etwa 94 % der ursprünglich vorhandenen Wirkstoffmenge gefunden werden.

Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass die diese Wirkstoffe betreffenden Versuche aus Kapitel 5 sich grundsätzlich von diesem Versuchsaufbau unterscheiden. Die Matrix aus den halbfesten Zubereitungen besteht zu einem großen Anteil aus lipophilen Bestandteilen, welche daher eine Hydrolyse zu unterdrücken vermag. Außerdem werden in den Zubereitungen, selbst bei fehlender Einflussnahme durch Puffersubstanzen auf den pH-Wert, nicht solche extremen pH-Werte erreicht. Diese Versuche zeigen jedoch, dass der pH-Wert einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität der Wirkstoffe und somit auf die therapeutische Wirksamkeit hat. Erythromycin ist davon in größerem Ausmaß betroffen als Metronidazol.

9.2 Anhang zu Kapitel 4 und Kapitel 6

In Kapitel 4 und 6 werden Effekte erwähnt, welche den *Priming*-Effekten fabrikneuer Trennsäulen ähneln. Es kommt bei diesen Säulen während der ersten Injektionen zu einer steigenden Signalintensität bzw. Peakfläche. Diesen Effekt kann man auch nach der Durchführung von Reinigungsprozeduren beobachten. Bei diesen Reinigungsprozeduren wird die stationäre Phase einer Trennsäule durch Pufferlösungen mit extremen pH-Werten (pH 3 oder pH 10, in Abhängigkeit der Chemie der stationären Phase) und organische Lösemittel von adsorbierten Stoffen befreit. Das Ausmaß dieses Effektes ist abhängig vom Protein, der stationären Phase und der mobilen Phase, wie weiter oben in dieser Arbeit erläutert wurde.

Es wurden Spülprozeduren mit 0,5 % SDS-Lösung, PBS pH 3 und Acetonitrilgradienten nach Betriebsanleitung des Herstellers durchgeführt und im Anschluss gleiche Volumina von Proteinlösungen injiziert. Bis auf den therapeutischen Antikörper, dessen Konzentration in der Probelösung 2,0 mg/mL betrug, lagen die anderen Proteine in einer Konzentration von 1,0 mg/mL vor. Es wurden jeweils 10 µL injiziert, entsprechend einer Proteinmenge von 10 µg.

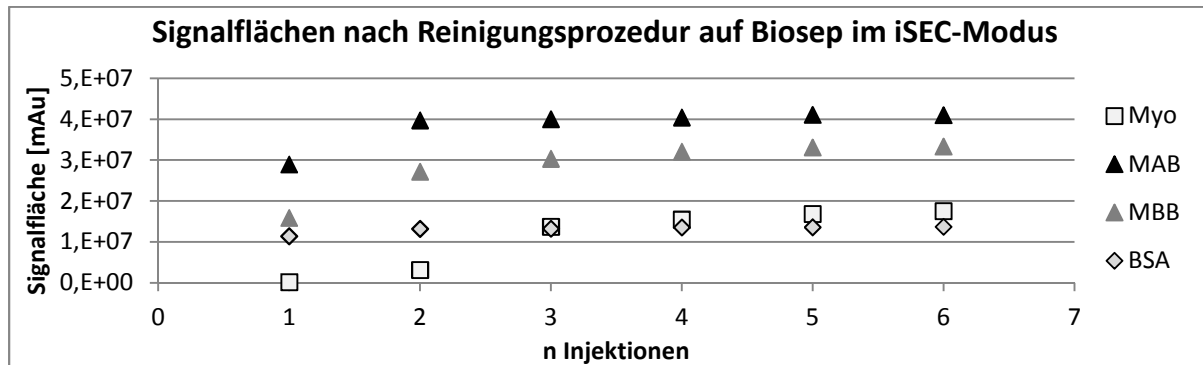


Abbildung 9.9 - Kontrollkarte über die Gesamtsignalflächen aller Proteinsignale im Chromatogramm von Myoglobin (Myo), therapeutischem Antikörper (MAB), bovinem Serum Albumin (BSA) und einer Mischung aus diesen Komponenten (MBB). Letztere bestand aus einer Mischung gleicher Volumenanteile der anderen Probenlösungen. Es wurde der iSEC-Modus verwendet. Als Trennsäule wurde die Biosep® S-3000, bei einer Flussrate von 1,0 mL/min verwendet. Detektiert wurde bei 207 nm.

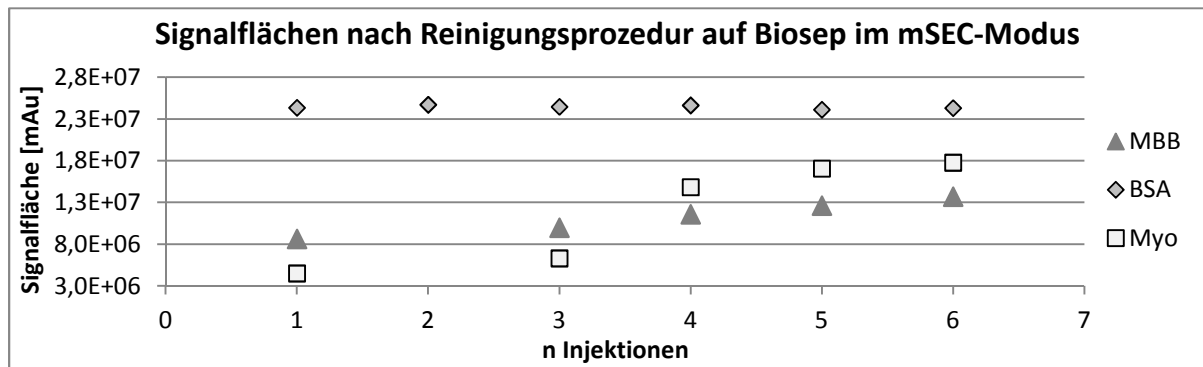


Abbildung 9.10 - Kontrollkarte über die Gesamtsignalflächen aller Proteinsignale im Chromatogramm von Myoglobin (Myo), therapeutischem Antikörper (MAB), bovinem Serum Albumin (BSA) und einer Mischung aus diesen Komponenten (MBB). Letztere bestand aus einer Mischung gleicher Volumenanteile der anderen Probenlösungen. Es wurde der mSEC-Modus verwendet. Als Trennsäule wurde die Biosep® S-3000, bei einer Flussrate von 1,0 mL/min verwendet. Detektiert wurde bei 207 nm. Für den therapeutischen Antikörper wurde über 6 Injektionen kein auswertbares Signal detektiert.

Nach etwa 50 µg stellt sich für die Proteine in beiden Modi eine Gleichgewichtslage ein und die Flächen bleiben stabil. BSA zeigt geringe Sättigungseffekte bei dieser Versuchsreihe. Es ist daher sinnvoll nach der Inbetriebnahme einer neuen Säule und nach Spülprozeduren einige Probeninjektionen durchzuführen und Trends in den Signalflächen genau zu beobachten.

ten. Kontrollkarten leisten hierfür eine gute Arbeit. Erst bei stabilen Signalfächern sollten die Resultate für die Auswertung der Ergebnisse herangezogen werden. Dies würde andernfalls womöglich zu einer Fehlinterpretation führen, wenn es um quantitative Fragestellungen geht.

Literaturverzeichnis

1. Bundestag, Bundesrat (2014), Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln - Arzneimittelgesetz, AMG
2. Suntharalingam G.; Perry M. R.; Ward S., et al. (2006), Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412, *The New England journal of medicine* 355(10):1018–1028
3. Schraven B.; Kalinke U. (2008), CD28 superagonists: what makes the difference in humans?, *Immunity Commentary* 28(5):591–595
4. Europäisches Arzneibuch 8.0 (2014), Monoklonale Antikörper für Menschen 8.0/2031, 1. Aufl., Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart
5. Schmidt D.; Szajek A. Y.; Atouf F., et al. (2015), USP publishes monoclonal antibody guidelines, *BioPharm International* 28(3):16–17
6. United States Pharmacopeia 39 (2016), Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies <129> - general chapter
7. Kaminski L. (2011), Aspekte des wirtschaftlichen und effizienten Einsatzes der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
8. Rakow T.; El Deeb S.; Hahne T., et al. (2014), Investigating effects of sample pretreatment on protein stability using size-exclusion chromatography and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, *Journal of separation science* 37(18):2583–2590
9. Kromidas S. (2000), HPLC - Made to Measure - A Practical Handbook for Optimization, Wiley-VCH, Weinheim, New York
10. Phenomenex (2012), Brochure: Yarra The New Standard in High Resolution Size Exclusion, URL: https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/yarra_broch.pdf, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
11. Redaktion des DAC/NRF (2001), Tabellen für die Rezeptur und Prüfung. Deutscher Arzneimittel-Codex, GOVI-Verag, Eschborn
12. Glaeske G.; Schicktanz C. (2014), Barmer GEK Arzneimittelreport 2014 - Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse, *Public Health Forum* 22(26)
13. IMS Institute for healthcare informatics (2015), Medicines Use and Spending Shifts - A Review of the Use of Medicines in the U.S. in 2014, URL: <http://www.imshealth.com/en/thought-leadership/ims-institute/reports/medicines-use-in-the-us-2014#ims-form>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
14. Lücke J.; Bädeker M.; Hildinger M. (2014), Biotech-Report Medizinische Biotechnologie in Deutschland 2014 - Biopharmazeutika: Wirtschaftsdaten und Nutzen für Patienten mit seltenen Erkrankungen, Studie, The Boston Consulting Group GmbH, URL:

- http://www.vfa-bio.de/vb-de/download-manager/_bcg2014.pdf, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
15. Wurm F. M. (2004), Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nature biotechnology* 22(11):1393–1398
 16. Wagner A. (2015), Zulassungen für gentechnisch hergestellte Arzneimittel - Die Liste unterliegt einer ständigen Aktualisierung. Stand: April 2015, vfa - Die forschenden Pharmaunternehmen, URL: <http://www.vfa.de/de/arzneimittel-forschung/datenbanken-zu-arzneimitteln/amzulassungen-gentec.html/genteczulassungen.pdf>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
 17. Goralczyk V.; Valentin M.; Berthold A., et al. (2006), Innovative Bioreaktoren auf Basis von biokompatiblen Keramik-Schaumstrukturen, *Chemie Ingenieur Technik* 78(9):1371
 18. Kompaktlexikon der Biologie (2001), Eintrag: Translation, Spektrum Akademischer Verlag, URL: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/translation/11990>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
 19. Ochsenbein A. F. (2008), Monoklonale Antikörper als therapeutische Substanzen, *Schweiz Med Forum* 8(8):140–143
 20. Kamionka M. (2011), Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*, *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12(2):268–274
 21. Zündorf I.; Dingermann T. (2001), Vom Rinder-, Schweine-, Pferde-Insulin zum Humaninsulin: Die biotechnische und gentechnische Insulin-Herstellung: Bereitstellung ausreichender Mengen von Humaninsulin, *Pharmazie in unserer Zeit* 30(1):28–32
 22. Winter J.; Neubauer P.; Glockshuber R., et al. (2000), Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA, *Journal of Biotechnology* 84(2):175–185
 23. Louie S. G.; Rho J. P. (2003), *Handbook of pharmaceutical biotechnology*, Pharmaceutical Products Press, New York [u.a.]
 24. Crommelin D. J. A.; Sindelar R. D.; Meibohm B. (2013), *Pharmaceutical biotechnology - Fundamentals and applications*, 4th edn., Springer Verlag, New York
 25. Bogner M. (2010), Bakkalaureatsarbeit - Hefe-basierte Produktion von Antikörpern mit verbesserten Eigenschaften, Bakkalaureatsarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien
 26. Liu H.; Gaza-Bulesco G.; Faldu D. (2008), Heterogeneity of monoclonal antibodies, *Journal of pharmaceutical sciences* 97(7):2426–2447
 27. Hulse W. L.; Gray J.; Forbes R. T. (2013), Evaluating the inter and intra batch variability of protein aggregation behaviour using Taylor dispersion analysis and dynamic light scattering, *International Journal of Pharmaceutics* 453(2):351–357
 28. Gaso-Sokac D.; Kovac S.; Clifton J., et al. (2011), Therapeutic plasma proteins--application of proteomics in process optimization, validation, and analysis of the final product, *Electrophoresis* 32(10):1104–1117
 29. C. A. Lipinski; Lombardo F.; Dominy B. W., et al. (2001), Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews* 46:3–26

30. Ghose A. K.; Viswanadhan V. N.; Wendloski J. J. (1999), A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases, *Journal of Combinatorial Chemistry* 1(1):55–68
31. Steinhilber D.; Roth H. J.; Schubert-Zsilavecz M., et al. (2005), *Medizinische Chemie - Targets und Arzneistoffe*, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart
32. D. Voet; J. Voet (2002), *Lehrbuch der Biochemie*, 1. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim
33. Kasper J. C.; Friess W. (2011), The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 78(2):248–263
34. S. Yoshoka; Yukio A.; Ken-ichi I. (1993), Aggregates Formed During Storage of β -Galactosidase in Solution and in the Freeze-Dried State, *Pharmaceutical Research* 10(5):687–691
35. Deng X.; Hahne T.; Schröder S., et al. (2012), The challenge to quantify proteins with charge trains due to isoforms or conformers, *Electrophoresis* 33(2):263–269
36. Dumetz A. C.; Snellinger-O'brien A. M.; Kaler E. W., et al. (2007), Patterns of protein protein interactions in salt solutions and implications for protein crystallization, *Protein science : a publication of the Protein Society* 16(9):1867–1877
37. Righetti P.G.; Caravaggio T. (1976), Isoelectric points and molecular weights of proteins - A table, *Journal of Chromatography* 127:1–28
38. D. Ackermann (1951), *Die Stoffe. Physiologische Chemie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
39. Heidelberger M.; Pedersen K. O. (1935), The molecular weight and isoelectric point of thyroglobulin, *The Journal of General Physiology* 19(1):95–108
40. Ui N. (1971), Isoelectric Points and conformation of proteins - Effect of urea on the behaviour of some Proteins in Isoelectric focusing, *Biochimica et biophysica acta* (229):567–581
41. Friesen A. D.; Jamieson J. C.; Ashton F. E. (1971), Effect of nonionic detergent on fractionation of proteins by isoelectric focusing, *Analytical Biochemistry* 41:149–157
42. Hermann Hager (1991), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis - Band 2: Methoden*, 5. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
43. E. Mutschler (2008), *Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
44. Bechthold A. (2013), *Pharmazeutische Biotechnologie kompakt*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
45. Deppe U. (2012), *Promotion Ulrich Deppe ohne Lebenslauf - Untersuchungen zur Charakterisierung und Standardisierung von Allergenextrakten aus Milbenkulturen*, Dissertation, Universität Paderborn
46. European Commission (2014), *Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use - Quality Control - EudraLex Volume 4 Chapter 6*

47. Bundestag, Bundesrat (2006), Verordnung über die Anwendung der Guten Herstellungspraxis bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen und über die Anwendung der Guten fachlichen Praxis bei der Herstellung von Produkten menschlicher Herkunft - Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung, AMWHV
48. United Nations (2003), Consolidated List of Products Whose Consumption And/or Sale Have Been Banned, Withdrawn, Severely Restricted Or Not Approved by Governments, 8. Aufl., United Nations Publications, New York
49. Kar A. (2005), Medicinal chemistry, 3rd edn., New Age International Limited, New Delhi
50. Klebe G. (2009), Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen, 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
51. Arzneibuchkommentar (2015), Chloramphenicol (4.00/0071), 1. Aufl. (51. Aktualisierung), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
52. Woodward R. B.; Logusch E.; Nambiar K. P., et al. (1981), Asymmetric total synthesis of erythromycin. 3. Total synthesis of erythromycin, *Journal of the American Chemical Society* 103(11):3215–3217
53. Arzneibuchkommentar (2015), Erythromycin (7.3/0179), 1. Aufl. (51. Aktualisierung), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
54. Sahm H.; Antranikian G.; Stahmann K.-P., et al. (2013), Industrielle Mikrobiologie, 1. Aufl., Springer Spektrum Verlag, Berlin, Heidelberg
55. International Conference on Harmonisation (2006), Impurities in New Drug Substances - ICH Q3A(R2)
56. International Conference on Harmonisation (2003), Stability Testing of New Drug Substances and Products - Q1A(R2)
57. Arzneibuchkommentar (2015), Metronidazol (4.00/0675), 1. Aufl. (51. Aktualisierung), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
58. Europäisches Arzneibuch 7.0 (2015), Metronidazol 7.0/0675, 4. Aufl., Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart
59. McFarland J. W.; Berger C. M.; Froshauer S. A., et al. (1997), Quantitative Structure-Activity Relationships among Macrolide Antibacterial Agents: In Vitro and In Vivo Potency against *Pasteurella multocida*, *Journal of medicinal chemistry* 40(9):1340–1346
60. International Conference on Harmonisation (2005), Validation of Analytical Procedures - Q2(R1)
61. Šatínský D.; Brabcová I.; Maroušková A., et al. (2013), Green chromatography separation of analytes of greatly differing properties using a polyethylene glycol stationary phase and a low-toxic water-based mobile phase, *Analytical and bioanalytical chemistry* 405(18):6105–6115
62. Płotka J.; Tobiszewski M.; Sulej A. M., et al. (2013), Green chromatography, *Journal of Chromatography A* 1307:1–20
63. Farré M.; Pérez S.; Gonçalves C., et al. (2010), Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment, *Trends in Analytical Chemistry* 29(11):1347–1362

64. Salgın U.; Salgın S. (2013), Effect of main process parameters on extraction of pine kernel lipid using supercritical green solvents - Solubility models and lipid profiles, *The Journal of Supercritical Fluids* 73:18–27
65. Rücker G.; Neugebauer M.; Willems G. G. (2001), *Instrumentelle pharmazeutische Analytik - Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden*, 3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
66. Meyer V. (2009), *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 10. Aufl., Wiley-VCH-Verl., Weinheim
67. Tswett M. (1906), Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls, *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 24(7):384–393
68. Martin A. J. P.; Synge R. L. M. (1941), A new form of chromatogram employing two liquid phases, *Biochemical Journal* 35(12):1358–1368
69. Engelhardt H. (1977), *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*, 2. Aufl. Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
70. Naushad M.; Khan M. R. (2014), *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry - Evaluation and Applications in Food Analysis*, CRC Press, London, New York
71. Knox J. H. (1999), Band dispersion in chromatography – a new view of A-term dispersion, *Journal of Chromatography A* 831(1):3–15
72. Majors R. E. (2008), Column Pressure Considerations in Analytical HPLC, *LCGC Europe* 21(5):1–7
73. Siouffi A.-M. (2006), About the C term in the van Deemter's equation of plate height in monoliths, *Journal of Chromatography A* 1126(1-2):86–94
74. Phenomenex, Kinetex Columns - Chromatography Product guide, URL: <http://www.phenomenex.co.kr/storage/ecatalogue/z186196.pdf>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
75. van Deemter J. J.; Zuiderweg F. J.; Klinkenberg A. (1956), Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science* 5(6):271–289
76. Gritti F.; Guiochon G. (2006), General HETP equation for the study of mass-transfer mechanisms in RPLC, *Analytical chemistry* 78(15):5329–5347
77. VWR International GmbH (2012), Brochure: Hitachi High Performance Liquid Chromatograph Chromaster - Produktbroschüre, URL: http://galachem.ru/uploads/2015/10/Chromaster_Brochure.pdf, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
78. Knauer (2016), AZURA HPLC Plus system, URL: http://www.knauer.net/de/produkt/translate_to_german_azura_hplc_plus_system.html, Zuletzt geprüft am: 21.01.16

79. Cabrera K. (2013), Kieselgelmonolithen vs. Core Shell-Materialien - Schnelle Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – HPLC mit monolithischen Kieselgelsäulen, Merck KGaA, URL: <http://www.git-labor.de/applikationen/chromatographie/schnelle-hochleistungsfluessigkeitschromatographie-hplc-mit-monolithis>, Zuletzt geprüft am: 18.01.16
80. Meyer V. R. (2006), Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim
81. El Deeb S.; Preu L.; Wätzig H. (2007), Evaluation of monolithic HPLC columns for various pharmaceutical separations: method transfer from conventional phases and batch to batch repeatability, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 44(1):85–95
82. Holleman A. F.; Wiberg E.; Wiberg N. (1995), *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, de Gruyter, Berlin
83. Rosenholm J. M.; Czuryzkiewicz T.; Kleitz F., et al. (2007), On the Nature of the Brønsted Acidic Groups on Native and Functionalized Mesoporous Siliceous SBA-15 as Studied by Benzylamine Adsorption from Solution, *Langmuir* 23(8):4315–4323
84. Wisotzky F. (2012), *Angewandte Grundwasserchemie, Hydrogeologie und hydrogeochemische Modellierung: Grundlagen, Anwendungen und Problemlösungen*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg
85. Merck Millipore, Hichrom Catalogue 9 - Purospher® , Purospher STAR, Aluspher® und Chiradex-Broschüre, HiChrom Ltd, URL: http://www.hichrom.com/assets/HichromCat9-pdfs/Merck_Millipore_p180.pdf, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
86. Phenomenex Säulen, Introducing New Kinetex Evo UHPLC/HPLC Columns, Phenomenex, URL: <http://www.phenomenex.com/Info/Page/2014knxevo#>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
87. Rustamov I. M.; Chitty M. C.; Farkas T., et al. (2009), pH Stable Chromatographic Media Using Templated Multilayer Organic/Inorganic Grafting(US Patent 7,563,367 B2)
88. Nakanishi K.; Soga N. (1991), Phase Separation in Gelling Silica–Organic Polymer Solution: Systems Containing Poly(sodium styrenesulfonate), *Journal of the American Ceramic Society* 74(10):2518–2530
89. Merck KGaA (2008), ChromBook 2008/09 - Chromatography at Merck, Experience drives Innovation
90. Unger K. K.; Tanaka N.; Machtejevas E. (2010), *Monolithic Silicas in Separation Science: Concepts, Syntheses, Characterization, Modeling and Applications*, Wiley, New York
91. Cabrera K. (2008), Recent Advances in Silica-Based Monolithic HPLC Columns, LCGC Europe Online - Special Issues, URL: <http://www.chromatographyonline.com/recent-advances-silica-based-monolithic-hplc-columns>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
92. Siouffi A.-M. (2003), Silica gel-based monoliths prepared by the sol–gel method - Facts and figures, *Journal of Chromatography A* 1000(1-2):801–818
93. Phenomenex (2008), Onyx - Phenomenex Monolith - Produktbroschüre, URL: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/f1755432-5059-4cd5-a628-4520b732b1d4.pdf>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16

94. Leinweber F. C.; Tallarek U. (2003), Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases, *Journal of Chromatography A* 1006(1-2):207–228
95. Merck KGaA (2015), *ChromBook - The world of chromatography in your hands*
96. Engelhardt H. (1975), *Trägermaterialien und stationäre Phasen*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
97. Engewald W.; Dettmer-Wilde K. (2014), *Practical Gas Chromatography - Theory of Gas Chromatography*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
98. Taylor T. (2014), Core–Shell Particles for HPLC — Present and Future, *LCGC North America* 32(4):1–2
99. Hayes R.; Ahmed A.; Edge T., et al. (2014), Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1357:36–52
100. Harris D. C.; Werner G.; Werner T. (2014), *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*, 8. Aufl., Springer Spektrum Verlag, Berlin, Heidelberg
101. Horváth K.; Felinger A. (2015), Influence of particle size and shell thickness of core-shell packing materials on optimum experimental conditions in preparative chromatography, *Journal of Chromatography A* 1407:100–105
102. Woodruff M (2014), UPLC or Core-Shell - Which is the Winner?, *Chromatography Today* (May/June):8–10
103. Kaminski L.; El Deeb S.; Wätzig H. (2008), Repeatability of monolithic HPLC columns while using a flow program, *Journal of separation science* 31(10):1745–1749
104. Meyer V. (2004), *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th ed., John Wiley, Chichester, New York
105. Koza S. (2012), Size-Exclusion Ultra Performance Liquid Chromatography for the Analysis of Covalent High Molecular Weight Insulin - Application Note, Waters Solutions, URL: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004271en.pdf>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
106. Duong P. T.; Martosella J. (2011), Separation of recombinant Human Erythropoietin (rEPO) Using Agilent Bio SEC-3 - Application Note, Agilent Technologies Inc., URL: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-9544EN.pdf>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
107. Trathnigg B. (2006), *Encyclopedia of Analytical Chemistry - Size Exclusion Chromatography of Polymers*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK
108. *Arzneibuchkommentar* (2015), *Ausschlusschromatographie* (4.00/2.2.30), 1. Aufl. (51. Aktualisierung), Govi-Verlag; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
109. Phenomenex (2015), *Brochure: Yarra X150 Bionert - Biomolecule characterization and purification at extremely affordable prices*, URL: <https://az621941.vo.msecnd.net/documents/83264536-faf5-4d39-b9eb-80c5fe0e23d0.pdf>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16

110. Phenomenex (2015), Brochure: Better recovery of biomolecules with bio-inert Hardware, URL: <https://az621941.vo.msecnd.net/documents/af1695d5-7b16-49cd-8678-da7825b8fd2b.pdf>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
111. VWR - Upchurch Scientific, Brochure: Lined Stainless Steel Tubing for Bio-UHPLC, URL: https://us.vwr.com/store/catalog/product.jsp?product_id=10666729, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
112. VICI Valco Instruments Co Inc (2014), Brochure: Nickel-Clad PEEK, URL: <http://www.vici.com/tube/ni-clad-peek.php>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
113. Kopaciewicz W.; Regnier F. E. (1982), Nonideal Size-Exclusion Chromatography of Proteins: Effects of pH at Low Ionic Strength, *Analytical Biochemistry* 126:8–16
114. Europäisches Arzneibuch 8.0 (2014), Niedermolekulare Heparine (8.0/0828) - Prüfung auf Identität, 4. Aufl., Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart
115. Europäisches Arzneibuch 8.0 (2014), Konzentrierte Filgrastim-Lösung (8.0/2206) - Prüfung auf Identität, 4. Aufl., Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart
116. Bioscience T., TSKgel Size Exclusion Columns - Produkt Broschüre, Tosoh, URL: http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/50628A87-A204-4053-8B02-4BF793DD579D/0/B15L34A_SECBrochure.pdf, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
117. Shalliker R. A.; Guiochon G.; Catchpoole H. J., et al. (2007), How Viscous Fingering Can Spoil Your Separation - And You May Not Even Suspect It, *BioProcess International TECHNICAL*:32–37
118. Fröhlich-Nowoisky J.; Pickersgill D. A.; Després V. R., et al. (2009), High diversity of fungi in air particulate matter, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(31):12814–12819
119. Mahler H.-C.; Friess W.; Grauschopf U., et al. (2009), Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis, *Journal of pharmaceutical sciences* 98(9):2909–2934
120. Chi E. Y.; Krishnan S.; Randolph T. W., et al. (2003), Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation, *Pharmaceutical Research* 20(9):1325–1336
121. Sharma M.; Luthra-Guptasarma M. (2009), Degradation of proteins upon storage at near-neutral pH: indications of a proteolytic/gelatinolytic activity associated with aggregates, *Biochimica et biophysica acta* 1790(10):1282–1294
122. Beerten J.; Schymkowitz J.; Rousseau F. (2012), Aggregation Prone Regions and Gate-keeping Residues in Protein Sequences, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12(22):1–9
123. Hess E. (1964), Sonic Energy Effects in Bovine Serum Albumin Solutions, *Science* 143:1176–1177
124. Perez-Moral N.; Adnet C.; Noel T. R., et al. (2011), The aggregative stability of β -lactoglobulin in glassy mixtures with sucrose, trehalose and dextran, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 78(2):264–270

125. Bhatnagar B. S.; Bogner R. H. (2007), Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization, *Pharmaceutical development and technology* 12(5):505–523
126. Mason T. J.; Peters D. (2002), *Practical sonochemistry - Uses and applications of ultrasound*, 2nd ed. Horwood publishing series in chemical science, Horwood, Chichester
127. M. Ashokkumar (1999), ultrasound assisted chemical processes, *Ultrasound Assisted Chemical Processes* 15(1):41–83
128. Li D.-J.; Song J.-F.; Xu A.-Q., et al. (2014), Optimization of the ultrasound-assisted synthesis of lutein disuccinate using uniform design, *Ultrasonics sonochemistry* 21(1):98–103
129. Płotka J., *Sonochemie*, URL: <http://www.organische-chemie.ch/OC/themen/sonochemie.htm>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
130. Gülseren I.; Güzey D.; Bruce B. D., et al. (2007), Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions, *Ultrasonics sonochemistry* 14(2):173–183
131. Lauterborn W.; VDI Technologiezentrum i.A.d. BMBF (2000), Zukünftige Technologien - Von der Kavitation zur Sonotechnologie, *Technologieanalyse* (32):34–35
132. Hieschler - Ultrasound Technology, Ultrasonic Degassing and Defoaming of Liquids, URL: https://www.hielscher.com/degassing_01.htm, Zuletzt geprüft am: 02.02.16
133. Lehmann P. M. (2007), Rosazea Epidemiologie, Pathogenese, Klinik und Therapie - Übersichtsarbeit, *Deutsches Ärzteblatt* 104(24):1741–1746
134. Reisdorf S. (2009), Mit Doxycyclin gegen Inflammation - Rosazeatherapie, *Deutsches Ärzteblatt* 106(43):2159
135. Deutschen Dermatologischen Gesellschaft DGG (2013), Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft - Rosazea - AMWF-Register Nr. 013/065
136. Deutscher Arzneimittelcodex / Neues Rezeptur Formularium (2010), NRF 11.138 - Hydrophile Erythromycin-Creme 2% mit Metronidazol 1%, Govi-Verlag, Frankfurt am Main
137. Bundestag, Bundesrat (2015), Verordnung über den Betrieb von Apotheken - Apothekenbetriebsordnung, ApBetrO
138. Ewering I. (2012), Helfer für die Rezeptur - Tipps zum Umgang mit Rührsystemen, PTA-Heute online, URL: <http://web.archive.org/web/20140126013951/http://www.ptaheute.de/rueckblick/the-men-des-monats/2012/18-2012.html>, Zuletzt geprüft am: 21.01.16
139. Laloo A.; Kanfer I. (1997), Determination of erythromycin and related substances by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 704(1-2):343–350
140. Mozafari M. (2015), Ultra small sample volume handling in capillary electrophoresis. In: *HPLC 2015 (ed) Final Program. High Performance Liquid Phase Separations & Related Techniques*
141. Ziegler A. S. (2013), Plausibilitäts-Check Rezeptur - Nach § 7 ApBetrO, 2. überarb. und erw. Aufl., Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart

142. Salo J.-P. K.; Kauhala J.Y.; Salomies H. (2003), On the hydrolytic behavior of tinidazole, metronidazole, and ornidazole, *Journal of pharmaceutical sciences* 92(4):739–746
143. Tong L.; Pérez S.; Gonçalves C., et al. (2011), Kinetic and mechanistic studies of the photolysis of metronidazole in simulated aqueous environmental matrices using a mass spectrometric approach, *Analytical and bioanalytical chemistry* 399(1):421–428
144. Limburg T. (2010), Von der AAS zur MAS - Analytik von Nichtmetallen, *GIT Labor-Fachzeitschrift*:736–739
145. Houska M.; Brynda E.; Kálal J. (1985), Protein-surface interactions studied by infrared spectroscopy, *Die Makromolekulare Chemie - Issue Supplement* 9:103–111
146. Teller D. C. (1976), Accessible area packing volumes and interaction surfaces of globular proteins, *Nature* 260:729–731
147. Fukuzaki, S., Urano, H.; Nagata K. (1995), Adsorption of Protein onto Stainless-Steel Surfaces, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80(1):6–11
148. Kim J. C. (1997), Adsorption behavior of β -lactoglobulin onto stainless steel surfaces, *Journal of Food Processing and Preservation* 21:303–317
149. Nakanishi K.; Sakiyama T.; Imamura K. (2001), On the Adsorption of Proteins on Solid Surfaces, a Common but Very Complicated Phenomenon 91(3):233–244
150. Hussein F. (2007), Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Proteinadsorption an Primärpackmitteln, Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
151. Bee J. S.; Davis M.; Freund E., et al. (2010), Aggregation of a monoclonal antibody induced by adsorption to stainless steel, *Biotechnology and bioengineering* 105(1):121–129
152. Mathes J.; Friess W. (2011), Influence of pH and ionic strength on IgG adsorption to vials, *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 78(2):239–247
153. Hildebrand N.; Köppen S.; Derr L., et al. (2015), Adsorption Orientation and Binding Motifs of Lysozyme and Chymotrypsin on Amorphous Silica, *J. Phys. Chem. C* 119(13):7295–7307
154. Sakiyama T.; Tanino K.; Urakawa M. (1999), Adsorption Characteristics of Tryptic Fragments of Bovine β -Lactoglobulin on a Stainless Steel Surface, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(5):536–541
155. Bartolo L. de; Gugliuzza A.; Morelli S., et al. (2005), Physico-Chemical Properties and Performance of Novel PEEK-WC Membranes Contacting Human Plasma and Proteins, *MSF* 480-481:257–268
156. Grotefend S. (2014), Präzision – ein erreichbares Kriterium in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von Proteinen und der Totalreflexionsröntgenfluoreszenzanalyse von Metallen, Dissertation, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

157. Vertegel A. A.; Siegel R. W.; Dordick J. S. (2004), Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 20(16):6800–6807
158. Bharti B.; Meissner J.; Findenegg G. H. (2011), Aggregation of silica nanoparticles directed by adsorption of lysozyme, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 27(16):9823–9833
159. Bos M. A.; Shervani Z.; Anusiem A. C., et al. (1994), Influence of the electric potential of the interface on the adsorption of proteins, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 3(1-2):91–100
160. Peters T. (1996), *All about albumin - Biochemistry, genetics, and medical applications*, Academic Press, San Diego
161. Welz B; Sperling M (2012), *Atomabsorptionsspektrometrie*, 4th ed., Wiley, Somerset
162. Felbel J. (2007), *Untersuchungen zur Miniaturisierung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf der Basis von Mikrochip-Thermocyclern*, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
163. Sweryda-Krawiec B.; Devaraj H.; Jacob G., et al. (2004), A New Interpretation of Serum Albumin Surface Passivation, *Langmuir* 20(6):2054–2056
164. Kendrew J. C.; Bodo G.; Dintzis. H. M., et al. (1958), A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis, *Nature* 181(4610):662–666
165. Franks F (2002), Protein stability: the value of 'old literature, *Biophysical Chemistry* (96):117–127
166. Grotefend S.; Kaminski L.; Wroblewitz S., et al. (2012), Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 71:127–138
167. *Europäisches Arzneibuch 8.0* (2015), *Pufferlösung pH 6,6 R*, 1. Aufl., Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart
168. Voigt R.; Fahr A. (2010), *Pharmazeutische Technologie*, 11. Aufl., Deutscher Apotheker-verlag, Stuttgart